

BỆNH VI KHUẨN THƯỜNG GẶP, NGUY HIỂM TRÊN CÁ RÔ PHI NUÔI: HIỆN TRẠNG VÀ THÁCH THỨC Ở VIỆT NAM

Đoàn Thị Ninh^{1,2}, Đặng Thị Lua^{1,2}, Kim Văn Vạn¹, Trương Đình Hoài¹

Cá rô phi có nhiều đặc tính phù hợp để phát triển nuôi theo hướng sản xuất hàng hóa và hiện tại là đối tượng nuôi chủ lực ở hơn 135 quốc gia trên thế giới. Tại Việt Nam, các hệ thống nuôi thâm canh cá rô phi cũng đã và đang phát triển rộng khắp ở nhiều vùng nhờ định hướng ưu tiên phát triển của Chính phủ. Tuy nhiên, cá nuôi trong các hệ thống nuôi thâm canh, nuôi lồng ở hệ thống hở ở sông hồ tiềm ẩn nhiều nguy cơ bùng phát dịch bệnh, đặc biệt là các bệnh do vi khuẩn. Nhiều loài vi khuẩn đã được báo cáo gây bệnh trên cá rô phi, trong đó 4 loài tác nhân vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm, thường gặp trên cá rô phi đã được nhận định bao gồm *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare* và *Edwardsiella ictaluri*. Mặc dù các nghiên cứu trên thế giới về các loài tác nhân gây bệnh này trên cá rô phi khá đa dạng và phong phú, các thông tin liên quan ở Việt Nam còn rất hạn chế, gây khó khăn cho quá trình phòng và kiểm soát dịch bệnh. Bài tổng quan này sẽ phân tích và tổng hợp tình hình nghiên cứu trên thế giới và tại Việt Nam về mức độ bùng phát bệnh, triệu chứng bệnh tích, quá trình phân lập và định danh, đặc tính độc lực, các biện pháp phòng và điều trị bệnh của 4 loài tác nhân gây bệnh này, đồng thời phân tích nhận định một số tồn tại và thách thức trong nghiên cứu và thực tiễn quản lý dịch bệnh cá rô phi. Bài tổng quan sẽ thông tin hữu ích, cung cấp cơ sở cho việc định hướng các nghiên cứu chuyên sâu về tác nhân cũng như biện pháp kiểm soát dịch bệnh trên cá rô phi nuôi tại Việt Nam.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá rô phi là đối tượng ăn tạp, dễ nuôi, chi phí nuôi thấp, có khả năng chống chịu tốt với các điều kiện nuôi bất lợi như mật độ nuôi cao, chất lượng nước suy giảm. Thịt cá rô phi là loại thịt trắng, ít xương dăm, phù hợp cho chế biến xuất khẩu và được thị trường ưa chuộng. Do đó, hoạt động nuôi rô phi thu hút nhiều sự quan tâm và hiện tại đã được nuôi chủ lực ở trên 135 quốc gia trên thế giới chỉ sau cá chép (FAO, 2018; Surachetpong và cs., 2020). Tại Việt Nam, cá rô phi được chính phủ Việt Nam định hướng phát triển thành ngành hàng sản phẩm chủ lực, hình thành các vùng nguyên liệu lớn trên các hồ chứa/sông, vùng nuôi tập trung trong ao ở khu vực đồng bằng để phục vụ chế biến xuất khẩu, với mục tiêu đến năm 2030, diện tích vùng nuôi đạt 40.000 ha; 1,8 triệu m³ lồng; sản lượng đạt 400.000 tấn (Bộ NN&PTNT, 2019).

Theo xu hướng chung của sản xuất hàng hóa, các hình thức nuôi mật độ thấp truyền thống được chuyển dịch sang nuôi thâm canh và chuyên canh với đặc trưng là mật độ nuôi cao, sử dụng nhiều thức

ăn nhằm tăng sản lượng nuôi. Tuy nhiên mặt trái của việc nuôi thâm canh tăng năng suất là vấn đề ô nhiễm môi trường nước và bùng phát dịch bệnh, đặc biệt là các bệnh truyền nhiễm lây lan giữa các cá thể trong cùng hệ thống nuôi và giữa các hệ thống nuôi, vùng nuôi khác nhau (Leal và cs., 2019). Mặc dù cá rô phi được coi là đối tượng nuôi có khả năng kháng bệnh tốt hơn các loài cá khác (Amal và Zamri-Saad, 2011), nhưng các nghiên cứu gần đây cho thấy, cá rô phi cũng mắc cảm với nhiều loại tác nhân gây bệnh (Nicholson và cs., 2020).

Do khả năng tồn tại tốt trong môi trường nước ngay cả khi không có ký chủ, vi khuẩn gây bệnh được coi là nhóm tác nhân có khả năng lây lan nhanh trên diện rộng trong hệ thống nuôi thủy sản (Novoslavskij và cs., 2016). Bài tổng quan này sẽ cập nhật, phân tích và đánh giá tình hình nghiên cứu trên thế giới và ở Việt Nam về bệnh vi khuẩn thường gặp và nguy hiểm trên cá rô phi để làm rõ các đặc điểm bệnh học, đồng thời đánh giá, so sánh hiện trạng và thách thức gặp phải của nghề nuôi cá rô phi ở Việt Nam nhằm có chiến lược phát triển bền vững đối tượng này.

¹ Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản 1

II. MỘT SỐ BỆNH DO VI KHUẨN THƯỜNG GẶP, NGUY HIỂM TRÊN CÁ RÔ PHI

2.1. Bệnh do vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*

2.1.1. Sự bùng phát bệnh do *A. hydrophila* trên cá rô phi và triệu chứng, bệnh tích

Nhiễm khuẩn huyết gây ra do một số loài *Aeromonas* spp. là bệnh thường gặp nhất trên cá rô phi. Trong đó loài *A. hydrophila* đã gây bùng phát bệnh trên cá rô phi nuôi ở nhiều nước trong thời gian gần đây với tỷ lệ chết lên đến 35-50% (Tartor và cs., 2021). Tại Việt Nam, bệnh do *A. hydrophila* đã được báo cáo trên một số loài cá nước ngọt, điển hình như cá tra (Quách Văn Cao Thi, 2017) và cá chiên (Trương Thị Mỹ Hạnh và cs., 2019), nhưng các thông tin công bố liên quan đến bệnh do *A. hydrophila* trên cá rô phi ở nước ta còn rất hạn chế.

Cá rô phi nhiễm *A. hydrophila* có các triệu chứng ban đầu như bơi tách đàn, mất định hướng, bỏ ăn, cơ thể chuyển màu tối và sẫm màu; xuất huyết da, gốc vây, miệng, cung mang, hậu môn; xuất huyết gan, ruột và sản sinh nhiều dịch xoang bụng (Abdel-Latif và Khafaga, 2020). Cá rô phi nuôi nhiễm *A. hydrophila* có thể biểu hiện bệnh ở dạng mạn tính, cá chết rải rác trong nhiều tuần, tỷ lệ chết tăng dần và có thể tích lũy ở mức rất cao, lên đến 80% khi có sự kết hợp của nhiệt độ nuôi tăng cao (Yardimci và Aydın, 2011).

2.1.2. Phân lập và định danh tác nhân gây bệnh

Vi khuẩn *A. hydrophila* thường được nuôi cấy, phân lập từ cá bệnh trên môi trường dinh dưỡng thông thường như TSA (tryptone soya agar) và TSB (tryptone soya broth). Ngoài ra, môi trường Rimler-Shotts (RS) cũng được sử dụng khi phân lập vi khuẩn này từ cá nước ngọt nhằm tăng tính chọn lọc với các nhóm vi khuẩn khác (Aboyadak và cs., 2017). Khuẩn lạc vi khuẩn *A. hydrophila* trên TSA hình tròn, hơi lồi, mờ đục, màu vàng nhạt sau 24h nuôi cấy ở 28-30°C và màu vàng trên RS (Aboyadak và cs., 2017). Vi khuẩn *Aeromonas* có một số đặc điểm hình thái đặc trưng như: là vi khuẩn gram âm, hình que ngắn, tròn 2 đầu (Pessoa và cs., 2019).

Quá trình định danh vi khuẩn *Aeromonas* rất phức tạp, cần có sự kết hợp giữa định danh theo hình thái, sinh hóa và theo sinh học phân tử. Các bộ test thử sinh hóa thông thường và các hệ thống test sinh hóa đã phát triển sẵn (API 20, Vitek, BBL Crystal...) đã được sử dụng nhưng có nhiều hạn chế trong định danh đến cấp độ loài *Aeromonas* do thường tạo ra đa dạng kết quả, vì vậy các phương pháp định danh bằng sinh học phân tử bao gồm giám định bằng PCR và giải trình tự gen cần được áp dụng (Pessoa và cs., 2019). Cho đến hiện tại, chưa có cập mới hoàn toàn đặc hiệu để biệt hóa được loài *A. hydrophila* bằng phương pháp PCR; trình tự gen *16S rRNA* giữa các loài chỉ khác nhau ở một số ít nucleotide (Kim và cs., 2014). Vì vậy, quá trình định danh cần kết hợp giải trình tự gen *16S rRNA* và gen housekeeping-HK, thường sử dụng gen *gyrB* và *rpoB* để đánh giá mức độ tương đồng về gen với chủng chuẩn *A. hydrophila* ATCC 7966 (Hoel và cs., 2017). Thực tế hiện nay các nghiên cứu về loài vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá ở Việt Nam mới chỉ dừng lại ở việc định danh bằng phương pháp truyền thống sử dụng sinh hóa hoặc có kết hợp với kỹ thuật PCR, không có khả năng biệt hóa hoàn toàn, và chưa cập nhật phương pháp định danh mới, chính xác hơn.

2.1.3. Đặc tính độc lực của vi khuẩn

Đặc tính độc lực của vi khuẩn được thể hiện qua nghiên cứu kiểu gen độc lực mà vi khuẩn mang và khả năng gây bệnh của vi khuẩn trên cá nhiễm bệnh. Vi khuẩn *Aeromonas* có kiểu gen độc lực phức tạp bao gồm nhiều dạng, nhiều thể cấu trúc khác nhau. Trong số đó, các gen mã hóa cho quá trình tiết các sản phẩm tiết ngoại bào như hemolysins, lipase, protease và các dạng độc tố enterotoxins được tập trung nghiên cứu do có vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhiễm và gây bệnh trên ký chủ (Beaz-Hidalgo và Figueras, 2013). Mức độ độc lực của các chủng vi khuẩn cũng được đánh giá qua các thí nghiệm cảm nhiễm, xác định khả năng gây chết và liều gây chết 50% (LD₅₀) trên ký chủ. Trên cá rô phi, kết quả đánh giá mức độ độc lực cũng khác nhau lớn giữa các báo cáo. Trong khi Hal và Manal (2020) chỉ ghi nhận tỷ lệ chết 42,75% trên cá rô phi sau 14 ngày tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* ở nồng độ 1×10⁵ CFU/ml, Pauzi và cs. (2020) báo cáo tỷ lệ chết 100% trên cá

điều hồng sau 10 ngày tiêm *A. hydrophila* ở nồng độ 10^5 CFU/ml, giá trị LD_{50} được xác định ở mức $1,1 \times 10^4$ CFU/ml.

2.2. Bệnh do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

2.2.1. Sự bùng phát bệnh do *S. agalactiae* trên cá rô phi và triệu chứng, bệnh tích

Bệnh do *S. agalactiae* trên cá rô phi đã được nhận diện từ rất sớm và hiện tại vẫn đang được quan tâm nghiên cứu do gây chết trên diện rộng và tỷ lệ chết rất cao (Leal và cs., 2019). Các đợt bùng phát bệnh do *S. agalactiae* trên cá rô phi thường diễn ra khi nhiệt độ môi trường nuôi cao trên 30°C (Najiah và cs., 2012) và đã được báo cáo ở nhiều nước nuôi cá rô phi với tỷ lệ chết lên đến 95% sau thời gian ngắn cá nhiễm bệnh (Ye và cs., 2011). Tại Việt Nam, bùng phát dịch bệnh do *Streptococcus* sp. (sau này được định danh là *S. agalactiae*) được ghi nhận đầu tiên vào năm 2009 tại miền Bắc với tỷ lệ chết lên tới 100% (RIA 1, 2009; số liệu không xuất bản). Bùng phát bệnh do *S. agalactiae* trên cá rô phi chính thức được báo cáo từ năm 2012 tại Tiền Giang (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012), và tiếp tục xuất hiện tại một số tỉnh miền Bắc năm 2014 (Trương Đình Hoài và cs., 2014) và gần đây là tại Huế (Nguyễn Ngọc Phước và cs., 2019). Quá trình lan truyền vi khuẩn gây bệnh Streptococcosis từ cá bệnh sang cá khỏe được cho là qua con đường thải phân chứa vi khuẩn và hấp thụ lại qua đường miệng (Amal và Zamri-Saad, 2011).

Biểu hiện đặc trưng khi cá nhiễm bệnh do *S. agalactiae* là giảm ăn, mất lồi 1 bên hoặc cả 2 bên, nhàn cầu chuyển màu trắng hoặc trắng đục, xuất huyết trên da, gốc vây hoặc quanh mắt, chướng bụng, xuất hiện các dấu hiệu bất thường liên quan đến hệ thần kinh như bơi mất phương hướng, bơi xoay tròn (Trương Đình Hoài, 2014). Ngoài ra, cá nhiễm bệnh cũng có dấu hiệu sản sinh nhiều dịch vàng trong xoang bụng, nội quan sưng, tăng kích cỡ, tụ máu hoặc xuất huyết và viêm màng não (Zamri-Saad và cs., 2010).

2.2.2. Phân lập, định danh tác nhân gây bệnh và phân nhóm kiểu hình serotype

Để phân lập vi khuẩn, mẫu thận, gan, lách, não và mắt được nuôi cấy trên môi trường TSA

hoặc BHIA (brain heart infusion agar) ở 28°C sau 24-48h (Suanyuk và cs., 2008). Vi khuẩn thuần được nuôi cấy trên môi trường thạch máu để thử khả năng dung huyết hồng cầu và được phân chia thành dung huyết hoàn toàn (β), một phần (σ) và nhóm không có khả năng dung huyết (Kannika và cs., 2017). Các đặc tính sinh hóa khác được xác định bằng bộ kit API-Strep (Suanyuk và cs., 2008). Phương pháp sinh học phân tử bằng kỹ thuật (PCR) dựa trên cặp mồi đặc hiệu cho loài phát triển bởi Li và cs. (2010) được sử dụng để giám định vi khuẩn *S. agalactiae*.

S. agalactiae được phân nhóm kiểu hình (serotype) theo phương pháp sinh học phân tử (multiplex-PCR) dựa trên cấu trúc polysaccharide (CPS) của lớp vỏ capsule (Poyart và cs., 2007). Tổng số 10 nhóm serotype đã được nhận dạng bao gồm Ia, Ib, và II-IX (Poyart và cs., 2007), mỗi serotype có đặc tính độc lực/khả năng gây bệnh khác nhau (Imperi và cs., 2010). Cho đến nay, 6 nhóm serotype được xác định trên các chủng *S. agalactiae* phân lập từ động vật thủy sản, bao gồm Ia, Ib, II, III, IX (Li và cs., 2013; Zhang và cs., 2018) và gần đây đã xác định được thêm serotype IV trên cá rô phi nuôi ở Nam Phi (Delannoy và cs., 2021).

Mức độ chiếm ưu thế của các serotype được báo cáo trong các nghiên cứu có sự khác biệt lớn. Sudpraseart và cs. (2020) xác định được tất cả 59 chủng *S. agalactiae* phân lập từ cá rô phi nuôi ở nhiều vùng khác nhau ở Đài Loan từ năm 2016-2018 đều thuộc serotype Ia. Tuy nhiên, Syuhada và cs. (2020) báo cáo trong tổng số 256 chủng *S. agalactiae* phân lập được từ cá rô phi nuôi ở Malaysia, có 89% chủng thuộc serotype III và 11% số chủng còn lại thuộc serotype Ia. Sự khác nhau về thành phần serotype của vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập từ cá rô phi cũng được báo cáo ở nhiều nước khác như Trung Quốc, Thái Lan, Brazil (Kannika và cs., 2017).

Việc xác định phân bố kiểu hình (serotype) của bộ chủng vi khuẩn đang lưu hành là thông tin quan trọng trong việc phát triển và lựa chọn loại vacxin phù hợp để phòng bệnh, đồng thời xác định được mức độ độc lực của tác nhân gây bệnh nhằm xây dựng phương án kiểm soát phù hợp. Tuy nhiên, các thông tin về sự có mặt và chiếm ưu thế của các

nhóm serotype của các chủng *S. agalactiae* trên cá rô phi nuôi ở Việt Nam rất hạn chế. Nghiên cứu của Phuoc và cs. (2021) phân nhóm serotype cho 3 chủng vi khuẩn thu được ở Đồng Tháp (III), An Giang (III) và Huế (Ib). Trong khi đó cá rô phi là một trong những đối tượng nuôi quan trọng ở miền Bắc, serotype của các chủng vi khuẩn gây bệnh tại miền Bắc hoàn toàn chưa được nghiên cứu và cần tập trung đánh giá trong thời gian tới.

2.2.3. Đặc tính độc lực của tác nhân vi khuẩn gây bệnh

Mức độ độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* được đánh giá qua sự có mặt của các gen độc lực và khả năng gây bệnh cho cá thí nghiệm khi cảm nhiễm. Đặc tính gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* được xác định thông qua sự có mặt của 14 gen độc lực được phân chia thành các nhóm mã hóa cho khả năng gắn bám (*fbxA*, *fbxB*, *pavA*, *lmb* và *scpB*), xâm nhập (*cylE*, *cfb*, *spb1*, *hylB*, *rib* và *bca*) và xâm nhiễm hệ miễn dịch (*bac*, *scpB*, *espA* và *pbp1A/ponA*) của cơ thể vật chủ (Lin và cs., 2011). Các nhóm serotype khác nhau mang đặc tính gen độc lực khác nhau. Kannika và cs. (2017) xác định được các chủng *S. agalactiae* serotype Ia phân lập được ở Thái Lan không mang 3 gen độc lực *lmb*, *scpB* và *spb1*, trong khi serotype III chỉ thiếu gen *bac*.

Mức độ độc lực của *S. agalactiae* cũng được đánh giá bằng phương pháp cảm nhiễm trên cá, tuy nhiên kết quả gây chết 50% cá thí nghiệm sau cảm nhiễm (LD_{50}) có sự khác biệt lớn giữa các nghiên cứu và giữa các chủng vi khuẩn. Trong khi giá trị LD_{50} của chủng *S. agalactiae* ST7/Ia và ST283/III trên cá rô phi được Syuhada và cs. (2020) báo cáo không có khác biệt lớn, lần lượt ở mức $8,7 \times 10^3$ CFU/ml và $6,3 \times 10^3$ CFU/ml. Suwannasang và cs. (2014) ghi nhận chủng thuộc serotype Ia có mức độ độc lực cao hơn serotype III với kết quả LD_{50} của chủng Ia và III trên cá rô phi tương ứng là $1,58 \times 10^6$ và $2,10 \times 10^8$ CFU/cá, trong khi serotype III có độc lực cao hơn Ib trên cá điêu hồng ở Việt Nam (Phuoc và cs., 2021). Hiện nay mức độ lưu hành các serotype và đặc tính độc lực của *S. agalactiae* chưa được nghiên cứu ở quy mô rộng, đặc biệt là chưa có nghiên cứu ở các tỉnh miền Bắc, nơi cá rô phi là một đối tượng nuôi chủ lực.

2.3. Bệnh do vi khuẩn *Flavobacterium columnare*

2.3.1. Sự bùng phát bệnh do *F. columnare* trên cá rô phi và triệu chứng, bệnh tích

F. columnare là tác nhân gây bệnh gây thiệt hại lớn về kinh tế cho các trại nuôi cá nước ngọt trên khắp thế giới (Declercq và cs., 2013). Bùng phát bệnh do *F. columnare* trên cá rô phi đã được báo cáo ở nhiều nước nuôi cá rô phi chủ lực như Thái Lan, Brazil, Malaysia với tỷ lệ chết lên đến 70% (Dong và cs., 2015). Bệnh thường xảy ra vào mùa mưa, thời tiết mát, đặc biệt các thời điểm giao mùa (Dong và cs., 2015). Trong hệ thống nuôi, cá sống sót qua đợt bùng phát bệnh có thể mang và giải phóng vi khuẩn ra môi trường và là nguồn lây cho cá thể khác trong vụ nuôi tiếp theo (Suomalainen và cs., 2005). Cá chết có thể gây lan truyền bệnh với tốc độ nhanh hơn so với cá sống (Declercq và cs., 2013). Thông tin về bệnh do *F. columnare* trên cá rô phi ở Việt Nam rất hạn chế.

Bệnh do vi khuẩn *F. columnare* thường xuất phát từ các tổn thương ban đầu trên vây và bề mặt cơ thể, phát triển thành các đám nhợt màu vàng, hoặc trắng xám, kèm theo hoại tử, xơ, mòn vây (Declercq và cs., 2013). Các vùng tổn thương, hoại tử nghiêm trọng ở mang gây xơ, bạc trắng tia mang dẫn đến cá mất khả năng hô hấp, là nguyên nhân chính gây tác động cấp tính và gây chết trên cá (Dong và cs., 2015). Ngoài ra, các vết loét có thể xuất hiện ở vùng niêm mạc miệng cá nhiễm bệnh, gây rách miệng, bội nhiễm vi khuẩn, dẫn đến cá bỏ ăn và có thể bị chết đói (Declercq và cs., 2013).

2.3.2. Phân lập và định danh tác nhân gây bệnh

Vi khuẩn *F. columnare* thường được phân lập từ các vết tổn thương ở mang và trên da; không phát triển trên môi trường giàu dinh dưỡng như TSA hoặc NA (Declercq và cs., 2013). Môi trường dùng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn này là Cytophagar, một số loại môi trường dinh dưỡng thấp khác cũng được sử dụng như môi trường Shieh, TYES hoặc môi trường có bổ sung polymyxin, neomycin (Cain và LaFrentz, 2007). Nhiệt độ tối ưu để nuôi cấy nằm trong khoảng 25-30°C, khuẩn lạc xuất hiện sau 24-48h nuôi cấy (Declercq và cs., 2013).

Định danh vi khuẩn *F. columnare* thường dựa vào các đặc điểm hình thái, sinh hóa và sinh học phân tử. *F. columnare* phát triển trên môi trường thạch với 3 dạng khuẩn lạc: dạng rỗ, dạng nhẵn không rỗ và dạng gồ ghề, nhám với khả năng dính bám và mức độ độc lực khác nhau (Kunttu và cs., 2011). Trong môi trường lỏng, vi khuẩn phát triển thành các búi sợi màu vàng dưới đáy và vòng nhớt dày trên bề mặt của ống nuôi cấy (biofilm) (Declercq và cs., 2013). Một số đặc tính hình thái, sinh hóa đặc trưng của *F. columnare* trên môi trường cytophaga bao gồm: khuẩn lạc màu vàng, dạng rỗ, bám chắc trên bề mặt thạch, tạo sắc tố flexirubin; vi khuẩn dạng sợi mảnh, dương tính với các phản ứng oxidase và catalase, O/F (Dong và cs., 2015). Phương pháp định danh bằng PCR thường sử dụng cặp primer phát triển bởi Welker và cs. (2005) với đoạn gen đích là *ISR*. Tuy nhiên, sản phẩm PCR tạo ra có nhiều kích cỡ khác nhau (từ 450-500bp). Gần đây, Mabrok và cs. (2020) phát triển cặp primer đặc hiệu khác dựa trên gen chondroitin AC lyase (*csIA*), kích cỡ 287 bp và có độ nhạy cao hơn.

2.3.3. Đặc tính độc lực của tác nhân vi khuẩn gây bệnh

Độc lực của vi khuẩn *F. columnare* được xác định thông qua ngâm cảm nhiễm và nuôi chung với cá nhiễm bệnh. Shoemaker và LaFrentz (2015) sử dụng liều ngâm từ $7,3 \times 10^6 - 5,3 \times 10^7$ CFU/ml trong thời gian 15 phút ghi nhận cá chết cấp tính với 100% cá thí nghiệm chết ở thời điểm 18-72h sau ngâm. Cá chết sau cảm nhiễm không xuất hiện triệu chứng bệnh đặc trưng như hoại tử trên mang, vây, da mà biểu hiện tăng tiết nhớt, da mất sắc tố, tăng cử động mang, mặc dù vẫn phân lập được vi khuẩn từ mang, não và thận của cá mới chết. Shoemaker và LaFrentz (2015) ghi nhận rằng khi sử dụng phương pháp cảm nhiễm nuôi chung cá khỏe với cá nhiễm bệnh, các dấu hiệu bệnh đặc trưng như bạc trắng mang, da xuất hiện rất nhanh trên cá cảm nhiễm (1-2h) và cá chết nhanh hơn (5-6h) so với khi cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm. Theo Declercq và cs. (2013), vi khuẩn *F. columnare* thể hiện tính chất hoại sinh và quá trình lây nhiễm từ cá nhiễm bệnh và chết do *F. columnare* sang cá khỏe hiệu quả hơn do tốc độ thoát vi khuẩn nhanh hơn. Vì vậy một số tác giả đã

giải thuyết rằng vi khuẩn khi được nuôi cấy, phát triển trên ký chủ sẽ có tính độc lực mạnh hơn so với khi được nuôi cấy bằng các môi trường dinh dưỡng do làm tăng khả năng sản sinh các chất độc tố ngoại bào (Suomalainen và cs., 2006). Ngoài ra, vi khuẩn *F. columnare* thoát ra từ ký chủ nhiễm bệnh cũng được cho là có khả năng hướng động đến ký chủ mới mạnh hơn làm tăng khả năng gắn bám và xâm nhập (Shoemaker và LaFrentz, 2015). Do đó việc loại bỏ cá chết, cá yếu nhiễm *F. columnare* ra khỏi hệ thống nuôi để giảm thiểu lây lan sang cá thể khỏe mạnh trong quần đàn là một trong những yêu cầu để hạn chế tỷ lệ chết do bệnh này gây ra.

2.4. Bệnh do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*

2.4.1. Sự bùng phát bệnh do *E. ictaluri* trên cá rô phi và triệu chứng, bệnh tích

E. ictaluri đã được báo cáo gây ra các đợt bùng phát bệnh với tỷ lệ chết cao trên cá rô phi nuôi ở khu vực tây bán cầu (Soto và cs., 2012), một số khu nuôi ở đồng bằng sông Cửu Long (Nguyễn Trọng Nghĩa và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2019) và ở nhiều tỉnh phía Bắc (Dong và cs., 2019; Đoàn Thị Ninh và cs., 2021). Với đặc điểm bệnh tích đặc trưng là gây hoại tử nội tạng, cá nhiễm bệnh chết nhanh với tỷ lệ cao, lên đến 60% nên *E. ictaluri* được các tác giả xác định là tác nhân gây bệnh nguy hiểm trên cá rô phi nuôi.

Các nhóm tác giả đều ghi nhận cá rô phi nhiễm *E. ictaluri* thể hiện đặc điểm bệnh tích rất rõ ràng và đặc trưng như xuất hiện đốm trắng hoại tử dày trên lách và thận. Tuy nhiên cá nhiễm bệnh không có biểu hiện lâm sàng rõ ràng ngoài dấu hiệu bơi lờ đờ, tách đàn hoặc một số ít cá thể đen thân, cơ thể tối màu. Do đó việc dựa trên các dấu hiệu bệnh bên ngoài để chuẩn đoán sớm cá rô phi nhiễm *E. ictaluri* gặp nhiều khó khăn và dễ chẩn đoán không chính xác, xác định bệnh ở giai đoạn nặng.

2.4.2. Phân lập và định danh tác nhân gây bệnh

Quá trình chẩn đoán tác nhân bệnh cần kết hợp dựa trên đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và sinh học phân tử như giải trình tự gen 16S-RNA, *gyrB* hay kỹ thuật PCR. Khuẩn lạc vi khuẩn phát triển trên môi trường TSA có dạng đầu kim, sau 36-48h (Dong và cs., 2019; Soto và cs., 2012). Vi

khuẩn gram âm, hình que, âm tính với oxidase và dương tính với catalase. Các đặc tính sinh hóa khác khi thử bằng kit API 20E cũng rất giống nhau giữa các chủng phân lập được trên cá rô phi nhưng ghi nhận một số kết quả khác so với chủng *E. ictaluri* phân lập từ cá nheo (Hawke và cs., 1981). Bước giám định vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR sử dụng primer đặc hiệu cho giống *Edwardsiella* kích cỡ sản phẩm 848bp và gen đặc hiệu cho loài *E. ictaluri* kích cỡ sản phẩm 470bp phát triển bởi Sakai và cs. (2009) hoặc 407bp (Panangala và cs., 2007). Quá trình định danh sâu hơn bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA và gyrB cũng được Dong cs. (2019) và Soto và cs. (2012) sử dụng.

2.4.3. Đặc tính độc lực của tác nhân vi khuẩn gây bệnh

Đặc tính độc lực của vi khuẩn *E. ictaluri* cũng được đánh giá qua sự có mặt của các vùng gen đặc biệt được gọi là đảo độc lực (Hacker cs., 2000). Một số gen chủ yếu được tập trung nghiên cứu bao gồm các gen mã hóa cho hệ thống tiết độc tố kiểu III (type III secretion system - T3SS), T3SS effector và T3SS effector/chaperone, các gen *ersC*, *eseI* và *escDeselI*; hệ thống tiết kiểu IV (type IV secretion system, T4SS), gen *virD4* và hệ thống tiết kiểu VI (type VI secretion system, T6SS), gen *evpC* (Roggecs., 2013). Sự có mặt của các gen độc lực này giúp vi khuẩn *E. ictaluri* có khả năng ký sinh nội bào, sống sót và nhân lên bên trong tế bào ở các hệ cơ quan của vật chủ (Chen và cs., 2017).

Độc lực của vi khuẩn *E. ictaluri* đã được Soto và cs. (2012) nghiên cứu trên cá rô phi vẫn và Dong và cs. (2019) trên cá điêu hồng. Cả hai nhóm tác giả đều ghi nhận cá cảm nhiễm xuất hiện đốm trắng nội tạng tương đồng với mẫu cá nhiễm bệnh thu từ tự nhiên. Trong đó Soto và cs. (2012) ghi nhận 100% cá chết sau 3-9 ngày cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm (10^6 CFU/ml) và tiêm (10^6 CFU/fish). Dong và cs. (2019) cũng báo cáo 100% sau 3 ngày tiêm nồng độ 10^7 CFU/cá và ở nồng độ $6,6-8,0 \times 10^5$ CFU/cá, trên 95% cá chết sau 9 ngày tiêm. Mặc dù, hai nhóm nghiên cứu đều chưa thực hiện cảm nhiễm trên dây nòng độ đủ rộng để đánh giá liều gây chết 50% (LD_{50}), nhưng đều ghi nhận được các mẫu cá chết sau khoảng 3-5 ngày tiêm có xuất hiện hoại tử nội tạng trên lách

và thận. Gần đây Nguyễn Trọng Nghĩa và Đặng Thị Hoàng Oanh (2019) và Đoàn Thị Ninh và cs. (2021) đã đánh giá liều LD_{50} khi tiêm vi khuẩn này trên cá điêu hồng và rô phi tương ứng ở mức $4,7 \times 10^2$ và $2,5 \times 10^1$ CFU/cá.

III. HIỆN TRẠNG VÀ THÁCH THỨC TRONG QUẢN LÝ DỊCH BỆNH CÁ RÔ PHI

3.1. Kháng kháng sinh

Ngoài *E. ictaluri* là loài vi khuẩn mới xuất hiện trên cá rô phi nên chưa có các báo cáo liên quan đến mức độ kháng kháng sinh của vi khuẩn này, các nghiên cứu đánh giá hiện trạng kháng kháng sinh đều ghi nhận tỷ lệ kháng cao và kháng với nhiều loại kháng sinh với vi khuẩn *A. hydrophila* và *S. agalactiae* phân lập từ cá rô phi. Đối với vi khuẩn *A. hydrophila*, nghiên cứu từ năm 2003 bởi Castro-Escarpulli và cs. (2003) trên 82 chủng *A. hydrophila* phân lập từ cá rô phi đông lạnh thu từ các chợ địa phương ở Mexico đều kháng với ampicillin, carbenicillin, cephalothin, clindamycin và penicillin và gần đây Pauzi và cs. (2020) cũng báo cáo *A. hydrophila* phân lập từ cá rô phi nuôi ở Malaysia đa kháng với amikacin, ampicillin, cefotaxime, amoxicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, erythromycin và streptomycin.

Đối với vi khuẩn *S. agalactiae*, Dangwetngam và cs. (2016) báo cáo hầu hết trong số 144 chủng phân lập từ cá rô phi nuôi tại Thái Lan đều kháng với oxolinic acid, gentamicin, sulfamethoxazole/trimethoprim và erythromycin, trong khi Liu và cs. (2018) báo cáo 75 chủng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập được từ cá rô phi nuôi tại Trung Quốc đều có tỷ lệ kháng trên 90% đối với aminoglycosides, sulfonamides, pipemidic acid, và norfloxacin; mức kháng thấp hơn (26,7–38,7%) đối với penicillin, ampicillin, và ciprofloxacin và dưới 10% số chủng kháng với furadantin, lincomycin, erythromycin, ofloxacin, tetracycline, và florfenicol.

Kết quả báo cáo về mức độ kháng/nhạy của vi khuẩn *F. columnare* đối với kháng sinh có sự khác biệt lớn giữa các nghiên cứu. Trong khi Tohmee và Deemagarn (2013) báo cáo 5/5 chủng phân lập từ cá rô phi chỉ kháng với colistin và đều nhạy với amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid,

ampicillin, ceftiofur, cephalothin, doxycycline, enrofloxacin, gentamicin, kanamycin, norfloxacin, streptomycin và tetracycline; El-Tawab và cs. (2020) ghi nhận 20/20 chủng kháng với amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, neomycin, polymyxin, tetracycline và 18/20 chủng kháng với cefixime và nitrofurantoin.

3.2. Nghiên cứu và sử dụng vaccin phòng bệnh

Nghiên cứu chế tạo và sử dụng vaccin là một trong những phương pháp phòng và kiểm soát bệnh truyền nhiễm cho động vật thủy sản ở nhiều nơi trên thế giới. Sử dụng vaccin hiệu quả giúp giảm nhanh lượng kháng sinh sử dụng trong điều trị bệnh. Tuy nhiên phương pháp phòng bệnh này cho động vật thủy sản ở khu vực Đông Nam Á còn rất hạn chế (Kayansamruaj và cs., 2020). Nghiên cứu chế tạo vaccin phòng *A. hydrophila* trên cá rô phi đã nhận được nhiều sự quan tâm trong bối cảnh bùng phát bệnh do vi khuẩn này diễn ra ở nhiều nơi và gây chết với tỷ lệ cao (Shirajum Monir và cs., 2020). Một số loại vaccin đã được nghiên cứu bao gồm vaccin nguyên bào vô hoạt đơn giá hoặc đa giá, vaccin nhược độc và vaccin tái tổ hợp. Nhiều loại vaccin nguyên bào vô hoạt đơn giá được chế tạo và cho kết quả bảo hộ phòng bệnh do *A. hydrophila* từ 50-100% tùy theo con đường sử dụng tiêm, ngâm, hoặc cho ăn (Sukenda và cs., 2017a). Loại vaccin nguyên bào vô hoạt đa giá được nghiên cứu để phòng bệnh cho nhiều loài *Aeromonas* hoặc do *A. hydrophila* và *S. agalactiae* cho kết quả RPS khoảng 80% sau 2 tháng tiêm (Sukenda và cs., 2017b). Vaccin nhược độc cũng được báo cáo cho kết quả bảo hộ cao, lên đến 92-100% sau 4 tuần tiêm (Pridgeon và cs., 2013). Tuy nhiên, việc sử dụng loại vaccin này tiềm ẩn nguy cơ đến môi trường hoặc vi khuẩn cường độc trở lại (Shirajum Monir và cs., 2020). Ngoài ra, các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* có đặc tính sinh hóa và kháng nguyên rất đa dạng và không đồng nhất, vì vậy hầu hết các loại vaccin nguyên bào vô hoạt hoặc nhược độc chỉ có tác dụng phòng cho serotype nhất định và trong thời gian hạn chế (Shirajum Monir và cs., 2020; Sukenda và cs., 2017a). Vaccin tái tổ hợp gần đây được nghiên cứu chế tạo cho kết quả RPS từ 55-82% (Fernandez và cs., 2014).

Trong thời gian gần đây, các nghiên cứu tạo

vaccin phòng bệnh *F. columnare* trên cá rô phi cũng được thực hiện dựa trên nền tảng vaccin phòng bệnh trên cá nheo mỹ. Một trong số các nghiên cứu được Kitiyodom và cs. (2019) thực hiện nhằm tăng cường hiệu quả của vaccin phòng bệnh columnaris trên cá rô phi theo phương pháp tạo vaccin kích cỡ nano bao bọc bằng chitosan có khả năng gắn bám cao vào dịch nhầy trên mang và da cá thu được kết quả RPS 60% sau 60 ngày ngâm vaccin. Nhóm vaccin nguyên bào vô hoạt bằng formaline và nhiệt đã được nghiên cứu từ sớm để phòng bệnh do *S. agalactiae* trên cá rô phi, tuy kết quả báo cáo giữa các nghiên cứu có sự khác biệt lớn với mức độ bảo hộ dao động lớn 49-80% (Zhang, 2021). Vaccin vô bào cũng đã được nghiên cứu trong những năm gần đây, tuy nhiên hiệu quả của vaccin nguyên bào hay vô bào đến nay vẫn không ổn định, trong khi đó các loại vaccin tái tổ hợp với hiệu quả và ổn định hơn nhưng giá thành cao và khó áp dụng, hầu hết các loại vaccin có khả năng bảo vệ chéo chưa cao nên thực tế chưa được sử dụng nhiều (Lics, 2019; Ma và cs., 2019; Wang và cs., 2018).

3.3. Một số thách thức của Việt Nam

Nghề nuôi cá rô phi được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn định hướng phát triển trở thành sản phẩm chủ lực, gắn sản xuất với thị trường tiêu thụ theo hướng xuất khẩu và tiêu thụ nội địa (Bộ NN&PTNT, 2019). Định hướng hình thành các vùng nuôi tập trung tạo vùng nguyên liệu cho chế biến theo hướng nuôi chuyên canh, thâm canh trong ao đầm, lồng/bè nuôi trên sông, hồ chứa. Tuy nhiên, các hệ thống nuôi chuyên canh, thâm canh sử dụng mật độ nuôi cao, lượng thức ăn sử dụng nhiều và chất thải từ hệ thống nuôi tạo ra lớn gây ô nhiễm môi trường, tích lũy chất thải hữu cơ, tăng biên độ dao động các thông số môi trường làm giảm khả năng kháng bệnh của cá. Ngoài ra, việc phát triển các mô hình nuôi lồng trên hệ thống sông, hồ như hiện nay rất khó kiểm soát môi trường và mầm bệnh, đây là điều kiện thuận lợi để các loại tác nhân gây bệnh lây lan, bùng phát thành dịch (Ninh và cs., 2021).

Để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn trên cá rô phi, nhiều các loại kháng sinh cũng thường được sử dụng. Tuy nhiên, các báo cáo cho thấy vi khuẩn gây bệnh trên cá rô phi đã kháng với nhiều loại kháng sinh, trong đó có những loại được phép sử

dụng và không được phép sử dụng ở Việt Nam (Ninh và cs., 2021). Hiện trạng sử dụng kháng sinh không đúng cách, quá liều, hoặc sử dụng kháng sinh không có hiệu quả làm giảm hiệu quả điều trị, nhờn thuốc, gia tăng nguy cơ kháng thuốc và lan truyền các chủng vi khuẩn kháng thuốc giữa các hệ thống nuôi (Dang và cs., 2021). Mặc dù vaccin phòng bệnh liên cầu khuẩn do *S. agalactiae* và *S. iniae* đã được thương mại hóa ở Việt Nam (Hồ Thu Thủy và cs., 2019). Tuy nhiên, thông tin về thành phần và kiểu serotype của các chủng *S. agalactiae* đang lưu hành ở Việt Nam hoàn toàn chưa được nghiên cứu, do vậy khả năng bảo hộ chéo giữa các nhóm serotype cũng như khả năng và hiệu quả sử dụng rộng rãi của các loại vaccin còn là câu hỏi cần tiếp tục nghiên cứu. Thực tiễn quản lý dịch bệnh cho thấy, cá rô phi bị đồng nhiễm nhiều tác nhân là hiện tượng diễn ra phổ biến, do vậy trong thời gian tới cần tiếp tục nghiên cứu đa dạng kiểu hình và khả năng bảo hộ chéo của vaccin hiện có, đồng thời cần phát triển các vaccin đa giá để phòng bệnh do vi khuẩn trên cá rô phi hiệu quả hơn.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.05-2020.18.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trương Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Thị Hạnh, Phạm Thị Yên, Lê Thị Mây, Nguyễn Quang Nghĩa, Phan Thị Vân và Phạm Thị Thanh, 2019. Tác nhân gây bệnh xuất huyết ở cá chiên (*Bagarius yarrelli*) nuôi lồng tại Tuyên Quang và đề xuất biện pháp phòng trị. *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 61(9).
2. Trương Đình Hoài, Nguyễn Vũ Sơn, Nguyễn Thị Hoài, Nguyễn Thị Mai Phương, Nguyễn Thị Hậu, 2014. Đặc điểm mô bệnh học của cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) nhiễm *Streptococcus* sp. nuôi tại một số tỉnh miền bắc Việt Nam. *J. Sci*, 12(3), 360-371.
3. Nguyễn Trọng Nghĩa và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2019. Khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trên cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 123-131.
4. Đoàn Thị Ninh, Đặng Thị Hóa, Trần Thị Trinh, Lê Việt Dũng, Nguyễn Thị Hương Giang, Kim Văn Vạn, Đặng Thị Lụa, Trương Đình Hoài, 2021. So sánh và đánh giá khả năng nhiễm chéo của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập từ cá rô phi và cá nheo mỹ trong điều kiện thực nghiệm. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 2021, 19(5): 605-615
5. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012. Phân lập và xác định đặc điểm của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* từ cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.) gây bệnh mù mắt và xuất huyết. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 203-212.
6. Nguyễn Ngọc Phước, Trần Thị Nhật Anh, Nguyễn Thị Huệ Linh, 2019. Phân lập và xác định một số đặc điểm sinh học các chủng *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi đỏ (*Oreochromis* sp.) nuôi tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp-Trường Đại học Huế*, 2019, 3(3): 1591-1601.
7. Quách Văn Cao Thi, 2017. *Nghiên cứu đặc điểm bệnh học và cơ chế đa kháng thuốc của hai loài vi khuẩn Edwardsiella ictaluri và Aeromonas hydrophila gây bệnh trên cá tra (Pangasianodon hypophthalmus) nuôi thâm canh ở đồng bằng sông Cửu Long*. Luận án Tiến sĩ, chuyên ngành Vi sinh vật học. Đại học Cần Thơ.
8. Hồ Thu Thủy, Nguyễn Hữu Vũ, Trần Thị Khánh Chi, Vũ Đức Hạnh, Nguyễn Bá Tiếp, Nguyễn Viết Không, Lại Thị Lan Hương, 2019. An toàn và hiệu lực của Vaccin Han-Streptila trên cá rô phi nuôi thương phẩm. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 2019, 17(2):83-91.
9. Viện Nghiên cứu NTTS 1 (RIA1), 2019. Báo cáo Khoa học nhiệm vụ cấp Bộ “Xác định nguyên nhân gây chết cá rô phi nuôi thương phẩm tại một số tỉnh miền Bắc”; chủ trì nhiệm vụ: Nguyễn Viết Khuê.
10. Abdel-Latif, H. M., và Khafaga, A. F., 2020. Natural co-infection of cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus* with *Aeromonas hydrophila* and *Gyrodactylus cichlidarum* experiencing high mortality during summer. *Aquaculture Research*, 51(5), 1880-1892.
11. Aboyadak, I. M., Ali, N. G. M., Goda, A. M. A. S., Saad, W., và Salam, A. M. E., 2017.

- Non-Selectivity of RS Media for *Aeromonas hydrophila* and TCBS Media for *Vibrio* species isolated from diseased *Oreochromis niloticus*. 8(496), 1-5. *J. Aquac. Res.*, 8(496), 5.
12. Amal, M., và Zamri-Saad, M., 2011. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 34(2), 195-206.
 13. Beaz-Hidalgo, R., và Figueras, M., 2013. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of fish diseases*, 36(4), 371-388.
 14. Cain, K. D., và LaFrentz, B. R., 2007. Laboratory maintenance of *Flavobacterium psychrophilum* and *Flavobacterium columnare*. *Current protocols in microbiology*, 6(1), 13B.11.11-13B.11.12.
 15. Castro-Escarpulli, G., Figueras, M., Aguilera-Arreola, G., Soler, L., Fernández-Rendón, E., Aparicio, G., Guarro, J., và Chacon, M., 2003. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International journal of food microbiology*, 84(1), 41-49.
 16. Chen, H., Yang, D., Han, F., Tan, J., Zhang, L., Xiao, J., Zhang, Y., và Liu, Q., 2017. The bacterial T6SS effector EvpP prevents NLRP3 inflammasome activation by inhibiting the Ca²⁺-dependent MAPK-Jnk pathway. *Cell host và microbe*, 21(1), 47-58.
 17. Dang, L. T., Nguyen, L. H. T., Pham, V. T., và Bui, H. T., 2021. Usage and knowledge of antibiotics of fish farmers in small-scale freshwater aquaculture in the Red River Delta, Vietnam. *Aquaculture Research*, 52(8), 3580-3590.
 18. Dangwetngam, M., Suanyuk, N., Kong, F., và Phromkunthong, W., 2016. Serotype distribution and antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus agalactiae* isolated from infected cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand: Nine-year perspective. *Journal of medical microbiology*, 65(3), 247-254.
 19. Declercq, A. M., Haesebrouck, F., Van den Broeck, W., Bossier, P., và Decostere, A., 2013. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. *Veterinary research*, 44(1), 1-17.
 20. Delannoy, C. M., Samai, H., và Labrie, L., 2021. *Streptococcus agalactiae* serotype IV in farmed tilapia. *Aquaculture*, 737033.
 21. Dong, H., LaFrentz, B., Pirarat, N., và Rodkhum, C., 2015. Phenotypic characterization and genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from red tilapia, *Oreochromis* sp., in Thailand. *Journal of fish diseases*, 38(10), 901-913.
 22. Dong, H., Senapin, S., Jeamkunakorn, C., Nguyen, V., Nguyen, N., Rodkhum, C., Khunrae, P., và Rattanarojpong, T., 2019. Natural occurrence of edwardsiellosis caused by *Edwardsiella ictaluri* in farmed hybrid red tilapia (*Oreochromis* sp.) in Southeast Asia. *Aquaculture*, 499, 17-23.
 23. El-Tawab, A., El-Hofy, F., EL-Gamal, R., Awad, S., El-Mougy, E., và Mohamed, S., 2020. Phenotypic and genotypic characterization of Antibiotic resistant strains of *Flavobacterium columnare* isolated from *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Benha Veterinary Medical Journal*, 38(2), 141-145.
 24. FAO, 2018. The state of world fisheries and aquaculture 2018. Meeting the Sustainable Development Goals. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, Rome (2018).
 25. Fernandez, J. B., Yambot, A. V., và Almeria, O., 2014. Vaccination of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using lipopolysaccharide (LPS) prepared from *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of Fauna and Biological Studies*, 1(4), 1-3.
 26. Hacker, J., và Kaper, J. B., 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 641-679.
 27. Hal, A. M., và Manal, I., 2020. Gene expression and histopathological changes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Aquaculture*, 526, 735392.
 28. Hawke, J. P., Macwhorter, A. C., Strigerwalt, A. G., và Brenner, D. J., 1981. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. *International journal*

- of systematic and evolutionary microbiology*, 31(4), 396-400.
29. Hoel, S., Vadstein, O., và Jakobsen, A. N., 2017. Species distribution and prevalence of putative virulence factors in mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from fresh retail sushi. *Frontiers in microbiology*, 8, 931.
 30. Imperi, M., Pataracchia, M., Alfarone, G., Baldassarri, L., Orefici, G., và Creti, R., 2010. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. *Journal of microbiological methods*, 80(2), 212-214.
 31. Kannika, K., Pisuttharachai, D., Srisapoom, P., Wongtavatchai, J., Kondo, H., Hirono, I., Unajak, S., và Areechon, N., 2017. Molecular serotyping, virulence gene profiling and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia farms in Thailand by multiplex PCR. *Journal of applied microbiology*, 122(6), 1497-1507.
 32. Kayansamruaj, P., Areechon, N., và Unajak, S., 2020. Development of fish vaccine in Southeast Asia: A challenge for the sustainability of SE Asia aquaculture. *Fish và shellfish immunology*, 103, 73-87.
 33. Kim, M., Oh, H.-S., Park, S.-C., và Chun, J., 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt_2), 346-351.
 34. Kitiyodom, S., Yata, T., Yostawornkul, J., Kaewmalun, S., Nittayasut, N., Suktham, K., Surassmo, S., Namdee, K., Rodkhum, C., và Pirarat, N., 2019. Enhanced efficacy of immersion vaccination in tilapia against columnaris disease by chitosan-coated "pathogen-like" mucoadhesive nanovaccines. *Fish và shellfish immunology*, 95, 213-219.
 35. Kunttu, H., Jokinen, E., Valtonen, E., và Sundberg, L. R., 2011. Virulent and nonvirulent *Flavobacterium columnare* colony morphologies: characterization of chondroitin AC lyase activity and adhesion to polystyrene. *Journal of applied microbiology*, 111(6), 1319-1326.
 36. Leal, C. A., Queiroz, G. A., Pereira, F. L., Tavares, G. C., và Figueiredo, H. C., 2019. *Streptococcus agalactiae* sequence type 283 in farmed fish, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 25(4), 776.
 37. Li, J., Ye, X., Lu, M., Deng, G., Tian, Y., Jiang, X., và Li, J., 2010. Rapid identification of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* with duplex PCR assay. *Journal of Hunan Agricultural University*, 36(4), 449-452.
 38. Li, L., Wang, R., Liang, W., Gan, X., Huang, T., Huang, Y., Li, J., Shi, Y., Chen, M., và Luo, H., 2013. Rare serotype occurrence and PFGE genotypic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in China. *Veterinary Microbiology*, 167(3-4), 719-724.
 39. Li, W., Li, Y., Hu, Y.-Z., Mo, X.-B., Xu, G.-H., Xie, L.-W., và Li, A.-X., 2019. GroEL, a novel vaccine candidate of piscine *Streptococcus agalactiae* identified by immunoproteome. *Fish và shellfish immunology*, 84, 377-383.
 40. Lin, F. P.-Y., Lan, R., Sintchenko, V., Gilbert, G. L., Kong, F., và Coiera, E., 2011. Computational bacterial genome-wide analysis of phylogenetic profiles reveals potential virulence genes of *Streptococcus agalactiae*. *PLoS One*, 6(4), e17964.
 41. Liu, C., Feng, J., Zhang, D., Xie, Y., Li, A., Wang, J., và Su, Y., 2018. Clustering analysis of antibiograms and antibiogram types of *Streptococcus agalactiae* strains from tilapia in china. *Microbial Drug Resistance*, 24(9), 1431-1439.
 42. Ma, J., Bruce, T. J., Jones, E. M., và Cain, K. D., 2019. A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches. *Microorganisms*, 7(11), 569.
 43. Mabrok, M., Chokmangmeepisarn, P., LaFrentz, B., Kayansamruaj, P., Dong, H., và Rodkhum, C., 2020. Development of a species-specific polymerase chain reaction for highly sensitive detection of *Flavobacterium columnare* targeting chondroitin AC lyase gene. *Aquaculture*, 521, 734597.
 44. Bộ NN&PTNT, 2019. Decision to approve the plan of tilapia farming development by 2020, driven by 2030" issued on May, 6th 2016. by the Ministry of Agriculture and Rural Development,

- Vietnam (Bộ NN&PTNT).
45. Najiah, M., Aqilah, N., Lee, K., Khairulbariyah, Z., Mithun, S., Jalal, K., Shaharom-Harrison, F., và Nadirah, M., 2012. Massive mortality associated with *Streptococcus agalactiae* infection in cage-cultured red hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* in Como River, Kenyir Lake, Malaysia. *Journal of Biological Sciences*, 12(8), 438-442.
 46. Ninh, D. T., Le, D. V., Van, K. V., Huong Giang, N. T., Dang, L. T., và Hoai, T. D., 2021. Prevalence, virulence gene distribution and alarming the multidrug resistance of *Aeromonas hydrophila* associated with disease outbreaks in freshwater aquaculture. *Antibiotics*, 10(5), 532.
 47. Nicholson, P., Mon-on, N., Jaemwimol, P., Tattiyapong, P., và Surachetpong, W., 2020. Coinfection of tilapia lake virus and *Aeromonas hydrophila* synergistically increased mortality and worsened the disease severity in tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture*, 520, 734746.
 48. Novoslavskij, A., Terentjeva, M., Eizenberga, I., Valciņa, O., Bartkevičs, V., và Bērziņš, A., 2016. Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review. *Annals of microbiology*, 66(1), 1-15.
 49. Panangala, V. S., Shoemaker, C. A., Van Santen, V. L., Dybvig, K., và 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.
 50. Pauzi, N. A., Mohamad, N., Azzam-Sayuti, M., Yasin, I. S. M., Saad, M. Z., Nasruddin, N. S., và Azmai, M. N. A., 2020. Antibiotic susceptibility and pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* isolated from red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*) in Malaysia. *Veterinary World*, 13(10), 2166.
 51. Pessoa, R. B. G., de Oliveira, W. F., Marques, D. S. C., dos Santos Correia, M. T., de Carvalho, E. V. M. M., và Coelho, L. C. B. B., 2019. The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial pathogenesis*, 130, 81-94.
 52. Phuoc, N. N., Linh, N. T. H., Crestani, C., và Zadoks, R. N., 2021. Effect of strain and environmental conditions on the virulence of *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus; GBS) in red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*, 534, 736256.
 53. Poyart, C., Tazi, A., Réglie-Poupet, H., Billoët, A., Tavares, N., Raymond, J., và Trieu-Cuot, P., 2007. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 1985-1988.
 54. Pridgeon, J. W., Klesius, P. H., và Yildirim-Aksoy, M., 2013. Attempt to develop live attenuated bacterial vaccines by selecting resistance to gossypol, proflavine hemisulfate, novobiocin, or ciprofloxacin. *Vaccine*, 31(18), 2222-2230.
 55. Rogge, M. L., Dubytska, L., Jung, T. S., Wiles, J., Elkamel, A. A., Rennhoff, A., Oanh, D. T. H., và Thune, R. L., 2013. Comparison of Vietnamese and US isolates of *Edwardsiella ictaluri*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 106(1), 17-29.
 56. Sakai, T., Yuasa, K., Sano, M., và Iida, T., 2009. Identification of *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda* by species-specific polymerase chain reaction targeted to the upstream region of the fimbrial gene. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21(2), 124-132.
 57. Shirajum Monir, M., Yusoff, S. M., Mohamad, A., và Ina Salwany, M., 2020. Vaccination of tilapia against Motile *Aeromonas* Septicemia: A review. *Journal of Aquatic Animal Health*, 32(2), 65-76.
 58. Shoemaker, C., và LaFrentz, B., 2015. Lack of association between *Flavobacterium columnare* genomovar and virulence in hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) × *Oreochromis aureus* (S teindachner). *Journal of fish diseases*, 38(5), 491-498.
 59. Soto, E., Griffin, M., Arauz, M., Riofrio, A., Martinez, A., và 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.
 60. Suanyuk, N., Kong, F., Ko, D., Gilbert, G. L., và Supamattaya, K., 2008. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile

- tilapia *O. niloticus* in Thailand—relationship to human isolates? *Aquaculture*, 284(1-4), 35-40.
61. Sudpraseart, C., Wang, P. C., và Chen, S. C., 2020. Phenotype, genotype and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from cultured tilapia (*Oreochromis* spp.) in Taiwan. *Journal of Fish Diseases*.
 62. Sukenda, S., Carman, O., Rahman, R., Hidayatullah, D., và Yumaidawati, N. S., 2017a. Vaccination in Nile tilapia broodstock with whole cell vaccine and disease resistance in its fry against *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 16(2), 268-276.
 63. Sukenda, S., Sumiati, T., Nuryati, S., Lusiastuti, A. M., và Hidayatullah, D., 2017b. Specific immune response kinetics and mortality patterns of tilapia *Oreochromis niloticus* on post-cocktail vaccination period against the infection of *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae*. *Omni-Akuatika*, 13(2).
 64. Suomalainen, L. R., Tirola, M., và Valtonen, E., 2005. Influence of rearing conditions on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 28(5), 271-277.
 65. Suomalainen, L.-R., Kunttu, H., Valtonen, E., Hirvelä-Koski, V., và Tirola, M., 2006. Molecular diversity and growth features of *Flavobacterium columnare* strains isolated in Finland. *Diseases of aquatic organisms*, 70(1-2), 55-61.
 66. Surachetpong, W., Roy, S. R. K., và Nicholson, P., 2020. Tilapia lake virus: The story so far. *Journal of Fish Diseases*, 43(10), 1115-1132.
 67. Suwannasang, A., Dangwetngam, M., Issaro, A., Phromkunthong, W., và Suanyuk, N., 2014. Pathological manifestations and immune responses of serotypes Ia and III *Streptococcus agalactiae* infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 36(5), 499-506.
 68. Syuhada, R., Zamri-Saad, M., Ina-Salwany, M., Mustafa, M., Nasruddin, N., Desa, M., Nordin, S., Barkham, T., và Amal, M., 2020. Molecular characterization and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* serotypes Ia ST7 and III ST283 isolated from cultured red hybrid tilapia in Malaysia. *Aquaculture*, 515, 734543.
 69. Tartor, Y. H., EL-Naenaeey, E.-S. Y., Abdallah, H. M., Samir, M., Yassen, M. M., và Abdelwahab, A. M., 2021. Virulotyping and genetic diversity of *Aeromonas hydrophila* isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in aquaculture farms in Egypt. *Aquaculture*, 541, 736781.
 70. Tohmee, N., và Deemagarn, T., 2013. A035-AQ008 *Flavobacterium columnare* isolated from brains of pond culture Nile tilapia in Thailand. *Abstracts 38th ICVS, Bangkok, Thailand*.
 71. Wang, Q., Wang, X., Wang, X., Feng, R., Luo, Q., và Huang, J., 2018. Generation of a novel *Streptococcus agalactiae* ghost vaccine and examination of its immunogenicity against virulent challenge in tilapia. *Fish và shellfish immunology*, 81, 49-56.
 72. Welker, T. L., Shoemaker, C. A., Arias, C. R., và Klesius, P. H., 2005. Transmission and detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Diseases of aquatic organisms*, 63(2-3), 129-138.
 73. Yardimci, B., và Aydin, Y., 2011. Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 58(1), 47-54.
 74. Ye, X., Li, J., Lu, M., Deng, G., Jiang, X., Tian, Y., Quan, Y., và Jian, Q., 2011. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China. *Fisheries Science*, 77(4), 623-632.
 75. Zamri-Saad, M., Amal, M., và Siti-Zahrah, A., 2010. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Comparative Pathology*, 143(2-3), 227-229.
 76. Zhang, Z., 2021. Research Advances on Tilapia Streptococcosis. *Pathogens*, 10(5), 558.
 77. Zhang, Z., Lan, J., Li, Y., Hu, M., Yu, A., Zhang, J., và Wei, S., 2018. The pathogenic and antimicrobial characteristics of an emerging *Streptococcus agalactiae* serotype IX in Tilapia. *Microbial Pathogenesis*, 122, 39-45./.