

## 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

Đoàn Thị Ninh<sup>1</sup>, Đặng Thị Hóa<sup>1</sup>, Trần Thị Trinh<sup>1</sup>, Lê Việt Dũng<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Hương Giang<sup>2</sup>, Kim Văn Vạn<sup>1</sup>, Đặng Thị Lụa<sup>3</sup>, Trương Đình Hoài<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam,

<sup>3</sup>Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1

\*Tác giả liên hệ: tdhoai@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 05.01.2021

Ngày chấp nhận đăng: 23.04.2021

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện để so sánh và đánh giá khả năng nhiễm chéo của chủng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh trên cá rô phi và cá nheo Mỹ. Các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá rô phi và cá nheo Mỹ nhiễm bệnh được so sánh về đặc điểm sinh hóa, giám định PCR, liều gây chết LD<sub>50</sub> và khả năng gây nhiễm chéo cho loài cá còn lại. Kết quả cho thấy, chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá rô phi và cá nheo Mỹ khác nhau ở 2/22 phản ứng sinh hóa (citrate utilization, Voges-proskauer) nhưng tương đồng về kết quả định danh bằng PCR. Chủng vi khuẩn *E. ictaluri* từ cá rô phi có độc lực rất cao cho loài cá này (LD<sub>50</sub> = 2,5 × 10<sup>1</sup> CFU/cá) nhưng thể hiện độc lực thấp khi được gây nhiễm chéo cho cá nheo Mỹ (LD<sub>50</sub> = 2,0 × 10<sup>6</sup> CFU/cá). Tương tự, chủng vi khuẩn phân lập từ cá nheo Mỹ có độc lực cao trên cá nheo Mỹ (LD<sub>50</sub> = 4,7 × 10<sup>3</sup> CFU/cá) nhưng giảm độc lực đáng kể khi gây nhiễm chéo cho cá rô phi (LD<sub>50</sub> = 2,5 × 10<sup>6</sup> CFU/cá). Như vậy, vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh trên cá nheo Mỹ và cá rô phi là khác nhau, nhưng ở nồng độ cao vẫn gây chết khi gây nhiễm chéo, do đó cần có các biện pháp đảm bảo an toàn sinh học để tránh việc lây lan mầm bệnh giữa các hệ thống nuôi.

Từ khóa: *Edwardsiella ictaluri*, rô phi, nheo Mỹ, độc lực, nhiễm chéo.

### Comparison and Evaluation of Cross-infection Possibility of *Edwardsiella ictaluri* Isolated from Tilapia and Channel Catfish under the Experimental Conditions

#### ABSTRACT

The study was conducted to compare and evaluate the cross-infection possibility of *Edwardsiella ictaluri* causing diseases in tilapia and Channel catfish. The strains of *E. ictaluri* isolated from tilapia and Channel catfish were compared based on the biochemical characteristics, PCR confirmation, lethal doses and the possibility of cross-infection among other fish species. The results revealed that *E. ictaluri* isolated from tilapia and Channel catfish differed in 2/22 biochemical reactions (citrate utilization, Voges-proskauer) but they were identical in PCR assay. The virulence of *E. ictaluri* strains from tilapia was high when they were challenged to tilapia (LD<sub>50</sub> = 2.5 × 10<sup>1</sup> CFU/fish) but remarkably decreased to Channel catfish (LD<sub>50</sub> = 2.0 × 10<sup>6</sup> CFU/fish). Similarly, the isolates from Channel catfish exhibited a high virulence in this fish (LD<sub>50</sub> = 4.7 × 10<sup>3</sup> CFU/fish) but reduced their pathogenicity to tilapia (LD<sub>50</sub> = 2.5 × 10<sup>6</sup> CFU/fish). The primary result demonstrates that *E. ictaluri* causing diseases in Channel catfish and tilapia differed in several characteristics. However, they cause relatively high mortality of fish when cross-infection among fish species at high bacterial densities. Thus, biosafety is required to avoid the spreading of pathogens in the culture systems.

Keywords: *Edwardsiella ictaluri*, tilapia, Channel catfish, lethal dose, cross-infection ability.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) là đối tượng nuôi mới, lớn nhanh, có giá trị kinh tế cao

nên được người nuôi lựa chọn và dần trở thành một trong những loài phổ biến ở khu vực phía Bắc, đặc biệt là các mô hình nuôi lồng bè hiện đang được phát triển và mở rộng nhanh trên

sông và các hồ chứa (Trương Đình Hoài & cs., 2020; Kim Văn Vạn, 2017). Cá rô phi (*Oreochromis* sp.) cũng là đối tượng nuôi truyền thống quan trọng của Việt Nam, đặc biệt có sự phát triển rộng khắp về diện tích nuôi ở nhiều tỉnh Miền Bắc trong những năm gần đây. Cá rô phi được coi là đối tượng nuôi chủ lực, được tạo điều kiện mở rộng quy mô nuôi và tăng sản lượng để phục vụ chế biến và xuất khẩu. Năm 2018, xuất khẩu cá rô phi đạt 7.900 tấn với tổng giá trị đạt khoảng 15,3 triệu USD. Năm 2019, xuất khẩu cá rô phi đạt hơn 8.000 tấn với kim ngạch 16 triệu USD. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn đã đề ra mục tiêu nâng sản lượng cá rô phi từ 225.000 tấn (2017) lên 400.000 tấn vào 2030, ở thời điểm này diện tích nuôi có thể tăng lên 40.000ha và 1,8 triệu m<sup>3</sup> nuôi lồng (MARD, 2019). Chính vì vậy, hiện nay các mô hình nuôi cá nheo Mỹ và cá rô phi đang phát triển mạnh, mang lại lợi nhuận cao, giải quyết sinh kế, mang lại thu nhập và giải quyết công ăn việc làm cho người dân địa phương.

Một vấn đề đặt ra hiện nay là dịch bệnh do *Edwardsiella ictaluri* đã và đang xuất hiện, gây bệnh trên cả cá nheo Mỹ (Trương Đình Hoài & cs., 2020), cá rô phi (Dong & cs., 2019; Soto & cs., 2012) tại Việt Nam. Tuy nhiên, sự xuất hiện của vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh cho cả cá nheo Mỹ và cá rô phi có liên quan đến nhau hay không, vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh trên cá nheo Mỹ và cá rô phi có giống nhau về đặc tính sinh học và có thể lây chéo cho nhau hay không là những câu hỏi cần được giải đáp để đề ra giải pháp trong quá trình phòng trị bệnh trên các hệ thống nuôi hiện nay.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và giám định các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh trên cá rô phi và cá nheo Mỹ nuôi lồng trên các hệ thống sông và hồ chứa ở một số tỉnh miền Bắc. Các chủng vi khuẩn sau đó được xác định mức độ độc lực trên động vật cảm nhiễm và được gây nhiễm chéo để so sánh và đánh giá khả năng gây bệnh giữa 2 loài cá ký chủ. Kết quả nghiên cứu nhằm cung cấp thông tin cho việc xây dựng các giải pháp phòng trừ dịch bệnh do *E. ictaluri* trên 2 đối tượng nuôi đang được ưa chuộng và phát triển mạnh tại miền Bắc Việt Nam.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cá rô phi (n = 40) và cá nheo Mỹ (n = 20) nhiễm bệnh và các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập và giám định từ cá rô phi (n = 4) và cá nheo Mỹ (n = 4) thu từ các vùng nuôi lồng khu vực phía Bắc Việt Nam năm 2020. Cá rô phi (cỡ 30-40g) và cá nheo Mỹ (cỡ 40-50g) phục vụ đánh giá độc lực và cảm nhiễm chéo. Môi trường Tryptic soya broth và Tryptic soya Agar (TSB và TSA; Merck). Bộ thuốc nhuộm vi khuẩn Gram (Merck); kit chiết tách DNA thương mại Insta Gene Matrix (Bio-Rad), GoTaq PCR green (Promega) và các hóa chất, máy móc, thiết bị trong phòng thí nghiệm phục vụ trong kỹ thuật PCR, phân tích kết quả, hệ thống bể thí nghiệm và một số trang thiết bị dụng cụ cần thiết khác.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Địa điểm và phương pháp thu mẫu

Để thực hiện nghiên cứu, chúng tôi đã tiến hành thu thập mẫu cá nheo Mỹ và cá rô phi nuôi lồng trên sông và hồ chứa nhiễm bệnh, có dấu hiệu hoại tử nội tạng và gây chết với tỷ lệ cao tại một số tỉnh miền Bắc như Hưng Yên, Hải Dương, Thái Bình và Hòa Bình. Mẫu được vận chuyển về và phân tích tại Phòng thí nghiệm Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, bằng phương pháp vận chuyển kín. Thời gian thu thập mẫu và thực hiện các thí nghiệm từ tháng 3 đến tháng 11/2020.

#### 2.2.2. Phân lập vi khuẩn gây bệnh

Sau khi giải phẫu, tiến hành lựa chọn những cá thể cá có dấu hiệu bệnh tích điển hình của bệnh do vi khuẩn *E. ictaluri* như xuất hiện nhiều đốm hoại tử trên các cơ quan gan, thận, lách. Dùng que cấy vô trùng thu mẫu vi khuẩn từ tiên thận cá bị bệnh và nuôi cấy trên môi trường TSA ở nhiệt độ 28°C. Các chủng vi khuẩn phân lập được quan sát hình dạng, màu sắc, kích thước khuẩn lạc và xác định hình thái vi khuẩn bằng nhuộm Gram theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit nhuộm Gram (Merck). Các chủng vi khuẩn sau phân lập được sử dụng để thử đặc tính sinh hóa bằng kit API 20E theo

hướng dẫn của nhà sản xuất (BioMerieux, Pháp) và bảo quản trong môi trường TSB bổ sung 20% glycerol (v/v) và giữ trong điều kiện âm sâu (-80°C) theo phương pháp của Trương Đình Hoài & cs. (2019) và Trương Đình Hoài & cs. (2020) để sử dụng cho các nội dung nghiên cứu tiếp theo.

### **2.2.3. Định danh và giám định vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri***

DNA từ vi khuẩn (n = 8; 4 chủng phân lập từ cá nheo Mỹ, 4 chủng phân lập từ cá rô phi) được tách chiết theo kit InstaGene™ Matrix (Bio-Rad). Quy trình chiết tách DNA được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kỹ thuật PCR dùng để giám định các chủng vi khuẩn sử dụng cặp mồi đặc hiệu khuếch đại đoạn gene 16S rRNA và gene xác định loài vi khuẩn *E. ictaluri* (Bảng 1).

Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 5,5 nuclease-free water; 12,5µl 2X Go Taq green master mix (Promega); 1µl Mồi ngược (10 pmole); 1µl mồi xuôi (10 pmole) và 5µl khuôn mẫu DNA. Đối chứng dương sử dụng trong phản ứng PCR là chủng *Edwardsiella ictaluri* LMG 7860, đây là chủng đối chứng dương chuẩn quốc tế phân lập từ cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) được cung cấp từ Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản II.

Chu trình nhiệt được thực hiện đối với đoạn mồi xác định giống *Edwardsiella* bao gồm: tiền biến tính ở 94°C trong 3 phút; chu kỳ lặp lại 30 lần: biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 55°C trong 30 giây, tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 2 phút; hoàn thành ở 72°C trong 5 phút. Chu trình nhiệt được thực hiện đối với đoạn mồi xác định loài *Ed ictaluri* có 3 bước bao gồm: tiền biến tính ở 94°C trong 3 phút; chu kỳ lặp lại 35 lần: biến tính ở 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 62°C trong 30 giây, tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 60 giây; hoàn thành ở 72°C trong 5 phút (Sakai & cs., 2009). Sản phẩm PCR được điện di trên gel 1,5% (TBE 1X) với thang DNA chuẩn 100bp (marker). Sử dụng nguồn điện di ở hiệu điện thế 100V cường độ 100mA, thời gian chạy điện di trong 30 phút. Sản phẩm PCR nếu dương tính sẽ cho vạch sáng ở vị trí lần lượt là 848 và 470bp.

### **2.2.4. Phương pháp cảm nhiễm xác định liều gây chết LD<sub>50</sub>**

Sau khi phân lập và giám định bằng kỹ thuật PCR, 4 chủng vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh từ mỗi loài cá với triệu chứng và bệnh tích điển hình được lựa chọn phục vụ thí nghiệm cảm nhiễm để xác định liều gây chết 50% (LD<sub>50</sub>) cho từng chủng. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy vào môi trường Nutrient Broth đạt mật độ  $5,0 \times 10^8$  CFU/ml (xác định bằng phương pháp đếm đĩa kết hợp đo mật độ quang ở bước sóng OD<sub>600</sub>). Dãy nồng độ vi khuẩn có nồng độ từ 10<sup>2</sup> đến 10<sup>8</sup> CFU/ml cho mỗi chủng vi khuẩn được chuẩn bị để cảm nhiễm cho cá với liều 0,1 ml/cá (tương ứng với liều 10<sup>1</sup> đến 10<sup>7</sup> CFU/cá).

Cá nheo Mỹ và cá rô phi được nuôi thích nghi 7 ngày trước khi sử dụng cho các thí nghiệm, được lấy mẫu kiểm tra để đảm bảo cá khỏe mạnh và không nhiễm bệnh. Với mỗi chủng vi khuẩn thử nghiệm, sử dụng hệ thống bể nuôi loại 100 lít, mỗi bể nuôi chứa 15 cá, được tiêm các nồng độ vi khuẩn từ 10<sup>1</sup> đến 10<sup>7</sup> CFU/cá, và 1 bể đối chứng được tiêm Phosphat buffer saline (PBS), thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Liều gây chết LD<sub>50</sub> được tính theo phương pháp của Reed & Muench (1938). Môi trường nước nuôi thí nghiệm được duy trì ở nhiệt độ 27 ± 1°C, pH 7,0-7,5 và không tiến hành thay nước trong quá trình nuôi cảm nhiễm. Những thay đổi về tập tính của cá, dấu hiệu bệnh lý và số lượng cá chết hàng ngày được theo dõi và ghi chép. Mẫu mô gan, thận, lách của cá cảm nhiễm được nhuộm Gram để kiểm tra sự hiện diện của vi khuẩn trong cơ thể, tiến hành phân lập và giám định lại vi khuẩn từ cá được cảm nhiễm bằng kỹ thuật PCR. Thí nghiệm được thực hiện trong 14 ngày sau khi tiêm cảm nhiễm.

### **2.2.5. Gây nhiễm chéo**

Sau khi xác định được giá trị LD<sub>50</sub> của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá rô phi và cá nheo Mỹ. Tiến hành lựa chọn chủng có giá trị LD<sub>50</sub> thấp nhất (độc lực cao nhất) để tiến hành cảm nhiễm chéo. Thí nghiệm gây nhiễm chéo được bố trí và thực hiện tương tự như thí nghiệm xác định liều gây chết LD<sub>50</sub> đã trình bày ở phần 2.2.4. Tuy nhiên, điểm khác biệt trong

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

thí nghiệm này là chủng vi khuẩn có độc lực cao phân lập từ cá rô phi được sử dụng để tiêm chéo cho cá nheo Mỹ và ngược lại. Dãy nồng độ vi khuẩn sử dụng để tiêm chéo là từ  $10^1$ - $10^7$  CFU/cá. Môi trường nước của các bể thí nghiệm được giữ ở nhiệt độ  $27\pm 1^\circ\text{C}$ , pH 7,0-7,5 và không tiến hành thay nước trong quá trình cảm nhiễm. Tình trạng sức khỏe, dấu hiệu bệnh lý và số lượng cá chết hàng ngày được theo dõi và ghi chép chi tiết. Các mẫu cá chết sau quá trình cảm nhiễm được giải phẫu để tổng hợp triệu chứng bệnh tích và phân lập vi khuẩn. Vi khuẩn sau phân lập lại được thử đặc tính sinh hóa và giám định bằng kỹ thuật PCR. Dấu hiệu lâm sàng, khả năng gây chết khi gây nhiễm trực tiếp và gây nhiễm chéo được so sánh và đánh giá. Thí nghiệm được thực hiện trong 14 ngày sau khi tiêm cảm nhiễm.

### 2.2.6. Xử lý số liệu

Các giá trị  $LD_{50}$ , tỷ lệ sống của cá trong các lô thí nghiệm và nồng độ gây nhiễm đều được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình cộng và độ lệch chuẩn (SD) sử dụng phần mềm Microsoft Excel.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

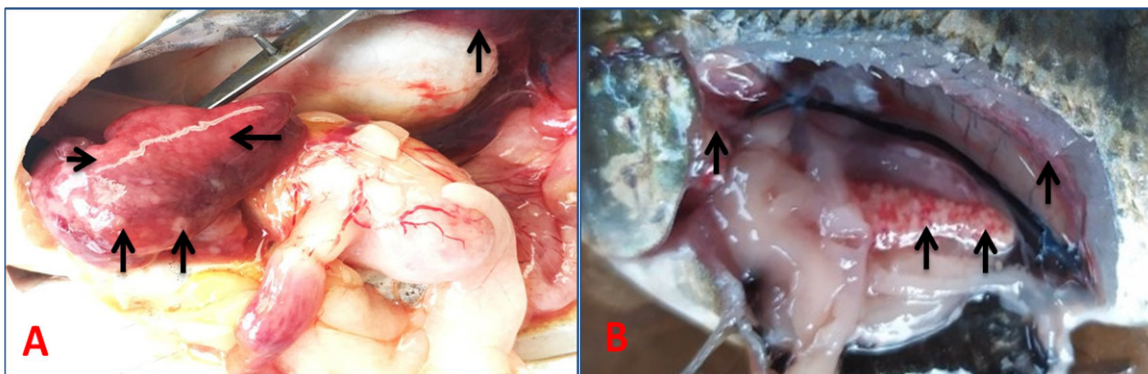
### 3.1. Kết quả kiểm tra đặc điểm bệnh tích, phân lập và giám định *Edwardsiella ictaluri* từ cá rô phi và nheo Mỹ

Cá rô phi và cá nheo Mỹ nhiễm bệnh xuất hiện các triệu chứng và bệnh tích điển hình do vi khuẩn *E. ictaluri* gây ra (Hình 1). Quan sát lâm sàng và giải phẫu kiểm tra cho thấy, cá nheo Mỹ nhiễm bệnh thường xuất hiện các đốm mũ tập trung dày ở gan và phân bố rải rác ở thận, trong khi đó với cá rô phi nhiễm bệnh, các đốm mũ thường xuất hiện nhiều ở lách, thận (đặc biệt là thận trước), tần xuất bắt gặp đốm mũ trên gan rất thấp so với trên cá nheo Mỹ.

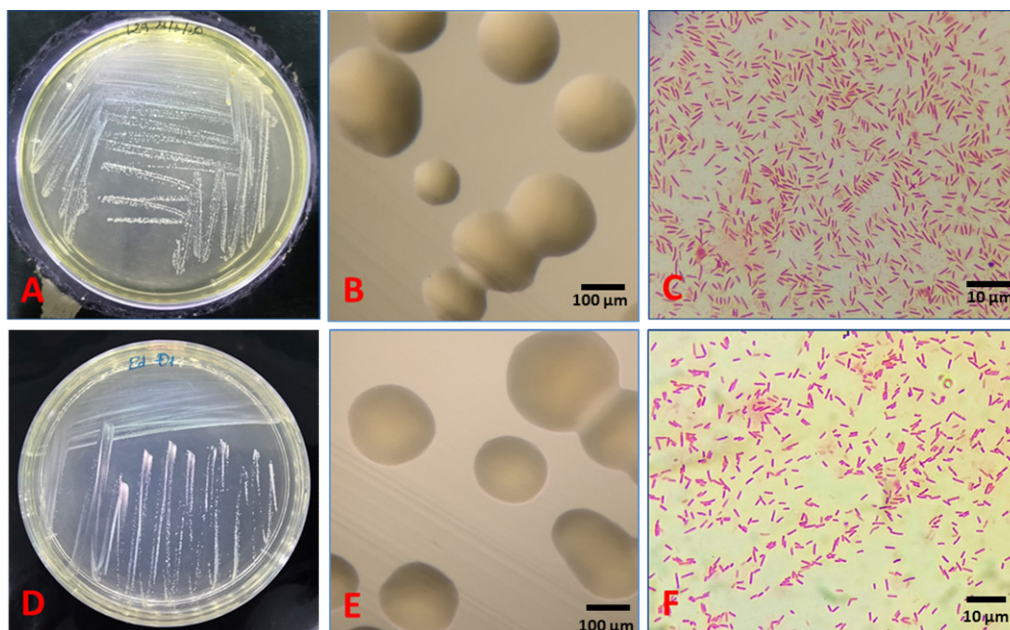
Chúng tôi tiến hành phân lập, thử đặc tính sinh hóa và giám định bằng kỹ thuật PCR cho 4 chủng đại diện phân lập từ mỗi loài cá. Kết quả cho thấy, vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ 2 loài cá đều phát triển trên môi trường thạch TSA sau 48h nuôi cấy trong điều kiện  $28^\circ\text{C}$ , khuẩn lạc có kích cỡ nhỏ, dạng đầu kim, màu trắng đục có rìa và bề mặt không đồng nhất. Vi khuẩn Gram âm, có dạng hình que (Hình 2).

**Bảng 1. Các cặp mồi sử dụng để giám định vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập từ cá nheo Mỹ và cá rô phi**

Gen đích	Trình tự đoạn mồi (5'→3')	Độ dài gen đích (bp)	Nguồn tham khảo
<i>Ed genus</i>	F: ACAGCCTGGAAGAGTCCTAC R: TTGAGAGTCGCTGCTTAC	848	Sakai & cs. (2009)
<i>Ed-ictaluri</i>	F: CAGATGAGCGGATTTACACAG R: CGCGCAATTAACATAGAGCC	470	



**Hình 1. Bệnh tích trên cá nheo Mỹ (A) và cá rô phi (B) nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* với đốm mũ trắng trên gan, thận ở cá nheo Mỹ và trên lách, thận ở cá rô phi (mũi tên)**



**Hình 2.** Vi khuẩn *E. ictaluri* phát triển trên môi trường TSA, hình thái khuẩn lạc và hình dạng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá nheo Mỹ (A-C) và cá rô phi (D-E)

Kết quả kiểm tra các đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được tổng hợp ở bảng 2 cho thấy 04 chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá rô phi phân lập được trong nghiên cứu (RPHB-02.20, RPTQ-04.20, RPHD-05.20, RPTB-05.20) có kết quả khác biệt đối với 2 phản ứng sinh hóa (Citrate utilization và Voges-proskauer) so với 04 chủng phân lập được trên cá nheo Mỹ nhiễm bệnh (NMHB-03.20, NMTQ-06.20, NMHD-04.20, NMTB-08.20) (Bảng 2). So sánh và đối chiếu kết quả thử đặc tính sinh hóa thu được trong nghiên cứu hiện tại với nghiên cứu trước đây cho thấy, các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập được từ cá rô phi trong nghiên cứu đều có sự tương đồng ở hầu hết các chỉ tiêu sinh hóa với chủng phân lập bởi Dong & cs. (2019). Sự khác biệt chỉ thể hiện ở phản ứng citrate utilization, trong khi 4/4 chủng vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu đều cho kết quả thử (+), chỉ có 3/4 chủng phân lập bởi Dong & cs. (2019) cho kết quả (+) và 1/4 chủng cho kết quả (-). Kết quả (+) với phản ứng citrate của các chủng từ cá rô phi trong nghiên cứu cũng tương đồng với đặc tính của chủng *E. ictaluri* phân lập từ cá điêu hồng ở khu vực Nam Bộ (Nguyễn Thị Ngọc Huyền & Đặng Thị Hoàng Oanh, 2020; Trương Trọng Nghĩa & Đặng Thị Hoàng Oanh,

2019), trong khi các chủng phân lập được từ cá nheo Mỹ trong nghiên cứu có đặc tính sinh hóa hoàn toàn tương đồng với chủng *E. ictaluri* phân lập được trên cá tra (Nguyễn Thị Ngọc Huyền & Đặng Thị Hoàng Oanh, 2020) và trên cá nheo Mỹ đã phân lập trước đây (Hawke & cs., 1981).

Kết quả giám định bằng kỹ thuật PCR cho thấy 4 chủng *E. ictaluri* phân lập được từ cá nheo Mỹ và 4 chủng phân lập được từ cá rô phi đều cho kết quả dương tính với cả 2 cặp môi: cặp môi giám định giống *Edwardsiella* (848bp) và cặp môi giám định loài *E. ictaluri* (470bp) sử dụng trong nghiên cứu. Do vậy, tất cả các chủng vi khuẩn phân lập được đều được định danh là *E. ictaluri* (Hình 3).

### **3.2. Kết quả xác định liều gây chết 50% trên cá thí nghiệm của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri***

Kết quả gây nhiễm thực nghiệm xác định liều gây chết 50% của 04 chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá nheo Mỹ và 04 chủng phân lập từ rô phi được thể hiện ở bảng 3 cho thấy giá trị  $LD_{50}$  của các chủng vi khuẩn phân lập từ cá rô phi ở mức  $2,5-2,9 \times 10^1$  CFU/cá, trong khi các chủng vi khuẩn phân lập từ cá nheo Mỹ có giá trị  $LD_{50}$  trong khoảng  $4,7-5,4 \times 10^3$  CFU/cá.

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

Trong đó chủng *E. ictaluri* NMHB-03.20 phân lập từ cá nheo Mỹ và chủng vi khuẩn *E. ictaluri* RPHB-02.20 phân lập từ cá rô phi có độc lực cao nhất, tương ứng với liều LD<sub>50</sub> thấp nhất, lần lượt là  $4,7 \times 10^3$  CFU/cá và  $2,5 \times 10^1$  CFU/cá.

Kết quả kiểm tra triệu chứng bệnh tích trên cá thí nghiệm cho thấy cá nheo Mỹ sau khi gây nhiễm xuất hiện các đốm trắng hoại tử tập trung nhiều ở gan và thận, rất ít xuất hiện đốm trắng ở lách (Hình 4). Trong khi đó, cá rô phi sau khi được tiêm cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* có xuất hiện các đốm mủ trắng tập trung chủ yếu ở lách và thận, ít quan sát thấy

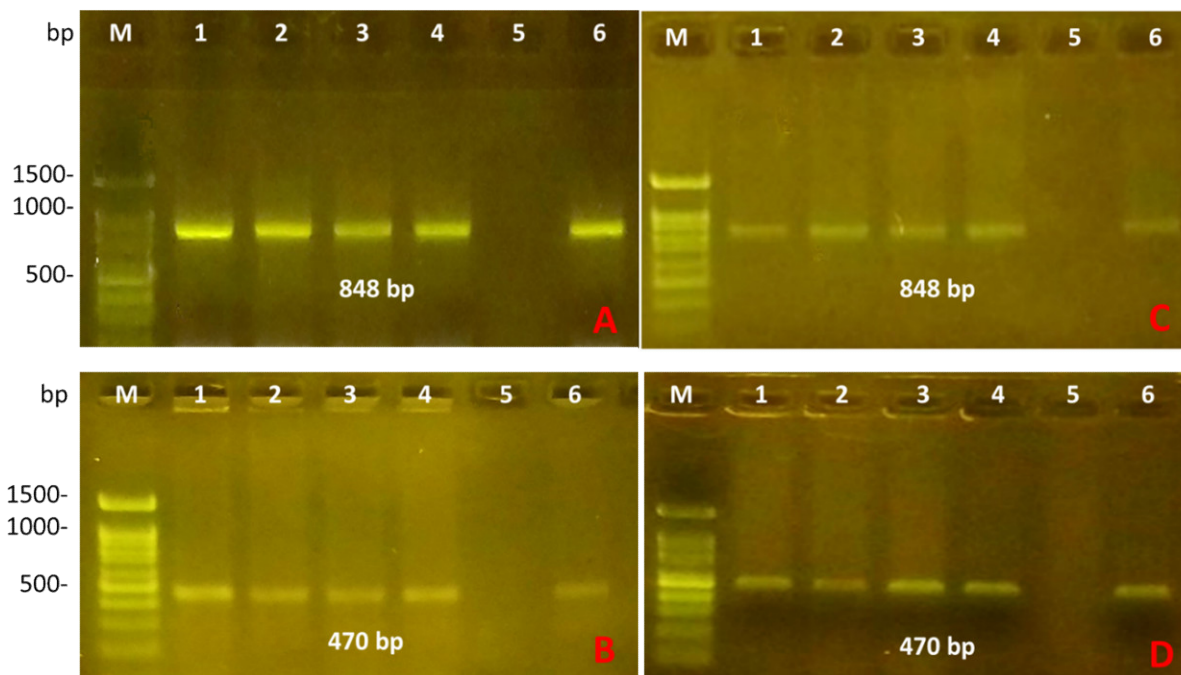
xuất hiện ở gan. Bệnh tích đại thể chính biểu hiện trên gan là xuất huyết và tụ huyết (Hình 5). Tất cả các lô cá được cảm nhiễm bệnh bị chết hoặc còn sống sau 14 ngày thí nghiệm đều được giám định đúng tác nhân gây bệnh là *E. ictaluri* bằng các phương pháp nhuộm tươi, nuôi cấy và giám định lại bằng kỹ thuật PCR. Như vậy, cá thí nghiệm sau khi được cảm nhiễm bằng vi khuẩn phân lập từ đúng loài cá ký chủ biểu hiện các triệu chứng và bệnh tích điển hình tương tự như trên cá nhiễm bệnh tự nhiên thu ngoài thực địa (Trương Đình Hoài & cs., 2020; Dong & cs., 2019).

**Bảng 2. So sánh đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh cho cá nheo Mỹ và cá rô phi**

Đặc điểm sinh hóa	Chủng <i>E. ictaluri</i> trên cá rô phi		Chủng <i>E. ictaluri</i> trên cá nheo Mỹ	
	NMHB-03.20 NMTQ-06.20 NMHD-04.20 NMTB-08.20	Đối chứng (Dong & cs., 2019)	RPHB-02.20 RPTQ-04.20 RPHD-05.20 RPTB-05.20	Đối chứng (Hawke & cs., 1981)
Nhuộm gram	Gram âm	Gram âm	Gram âm	Gram âm
Hình thái vi khuẩn	Trực khuẩn	Trực khuẩn	Trực khuẩn	Trực khuẩn
Oxidase	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+
ONPG	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	-	-	+	+
Citrate utilization	+	D	-	-
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-
Voges-proskauer	+	+	-	-
Gelatin	-	-	-	-
Acid production				
D-glucose	+	+	+	+
D-mannitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
D-sorbitol	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-
D-sucrose	-	-	-	-
D-melibiose	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-
L-arabinose	-	-	-	-

Ghi chú: D: dao động (+ hoặc -).





**Hình 3. Kết quả giám định PCR các chủng *E. ictaluri* trên cá nheo Mỹ (A-B) và cá rô phi (C-D) sử dụng cặp môi định danh giống *Edwardsiella* (848bp) và cặp môi định danh loài *Edwardsiella ictaluri* (470bp)**

**Bảng 3. Kết quả xác định liều gây chết 50% cá thí nghiệm ( $LD_{50}$ ) của các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập được từ cá bệnh**

Loài cá phân lập	Tên chủng vi khuẩn	Loài cá cảm nhiễm	Địa điểm thu mẫu	Liều gây chết $LD_{50}^*$ (CFU/cá)
Cá nheo Mỹ	<i>E. ictaluri</i> NMHB-03.20	Nheo Mỹ	Hòa Bình	$4,7 \times 10^3$
	<i>E. ictaluri</i> NMTQ-06.20		Tuyên Quang	$5,4 \times 10^3$
	<i>E. ictaluri</i> NMHD-04.20		Hải Dương	$4,9 \times 10^3$
	<i>E. ictaluri</i> NMTB-08.20		Thái Bình	$5,3 \times 10^3$
Cá rô phi	<i>E. ictaluri</i> RPHB-02.20	Rô phi	Hòa Bình	$2,5 \times 10^1$
	<i>E. ictaluri</i> RPTQ-04.20		Tuyên Quang	$2,8 \times 10^1$
	<i>E. ictaluri</i> RPHD-05.20		Hải Dương	$2,7 \times 10^1$
	<i>E. ictaluri</i> RPTB-05.20		Thái Bình	$2,9 \times 10^1$

Ghi chú: \*Liều gây chết  $LD_{50}$  trung bình của 3 lần thí nghiệm lặp lại.

### 3.3. Kết quả gây nhiễm chéo và đánh giá độc lực

Dựa vào kết quả đánh giá độc lực các chủng vi khuẩn gây bệnh cho từng loài cá, chủng vi khuẩn có độc lực cao nhất trên cá nheo Mỹ (*E. ictaluri* NMHB-03.20) và cá rô phi (*E. ictaluri* RPHB-02.20) được lựa chọn để gây nhiễm chéo cho nhau. Đây cũng là 2 chủng vi khuẩn được phân lập từ các trại nuôi cá rô phi

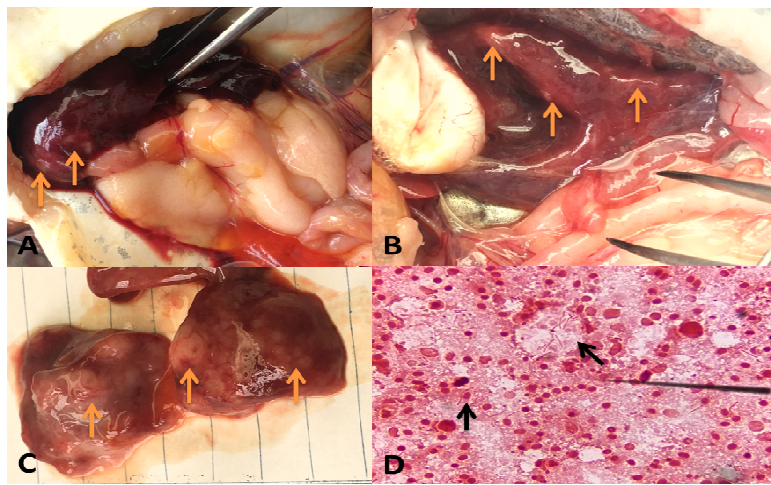
và cá nheo Mỹ tại hồ Hòa Bình. Kết quả xác định độc lực, khả năng gây chết khi gây nhiễm chéo được thể hiện ở hình 6 và hình 7.

Kết quả gây nhiễm chéo cho thấy vi khuẩn *E. ictaluri* NMHB-03.20 phân lập từ cá nheo Mỹ không thể hiện độc lực mạnh trên cá rô phi như khi gây nhiễm trực tiếp cho cá nheo Mỹ. Liều gây chết  $LD_{50}$  của chủng *E. ictaluri* NMHB-03.20 trên cá rô phi là  $2,51 \times 10^6$

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

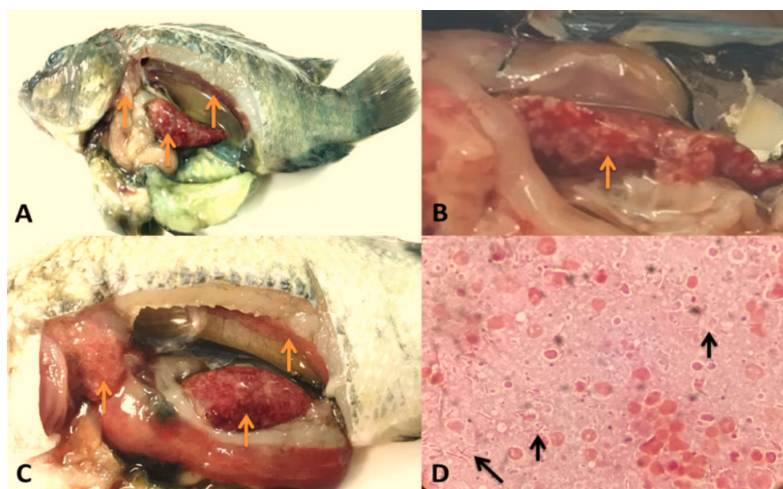
CFU/cá. Ngoài ra, các biểu hiện bệnh tích trên cá rô phi khi tiêm cảm nhiễm chủng *E. ictaluri* NMHB-03.20 phân lập từ cá nheo Mỹ không giống với biểu hiện khi cá rô phi mắc bệnh ngoài thực địa, các đốm trắng đặc trưng chỉ xuất hiện rải rác ở thận, tần suất bắt gặp ở gan cũng rất thấp và hoàn toàn không xuất hiện trong lách (Hình 8A). Tương tự như vậy, chủng vi khuẩn *E. ictaluri* RPHB-02.20 phân lập từ cá rô phi khi gây nhiễm cho cá nheo Mỹ có liều gây chết 50% LD<sub>50</sub> là  $1,99 \times 10^6$  CFU/cá, cao hơn rất nhiều so với giá trị LD<sub>50</sub> khi gây nhiễm cho cá rô phi ( $2,5 \times 10^1$  CFU/cá). Kết quả

kiểm tra tất cả các lô cá nheo Mỹ được gây nhiễm cũng không xuất hiện bệnh tích điển hình, không xuất hiện các đốm trắng hoại tử trên gan và thận như khi được gây nhiễm trực tiếp hoặc khi cá nhiễm bệnh tự nhiên ngoài thực địa (Hình 8C). Kiểm tra mẫu thận từ cá được gây nhiễm chéo bằng phương pháp nhuộm tươi đều cho thấy sự có mặt của vi khuẩn *E. ictaluri* mật độ cao trên mẫu mô thận (Hình 8B và 8D). Như vậy, mặc dù tồn tại với mật độ cao trong cơ thể cá cảm nhiễm nhưng khả năng gây bệnh của vi khuẩn *E. ictaluri* trên loài cá được gây nhiễm chéo đã giảm đi rất đáng kể.



Ghi chú: A-C: Các đốm trắng xuất hiện trên gan, thận cá; D: vi khuẩn *E. ictaluri* nhuộm tươi thận cá.

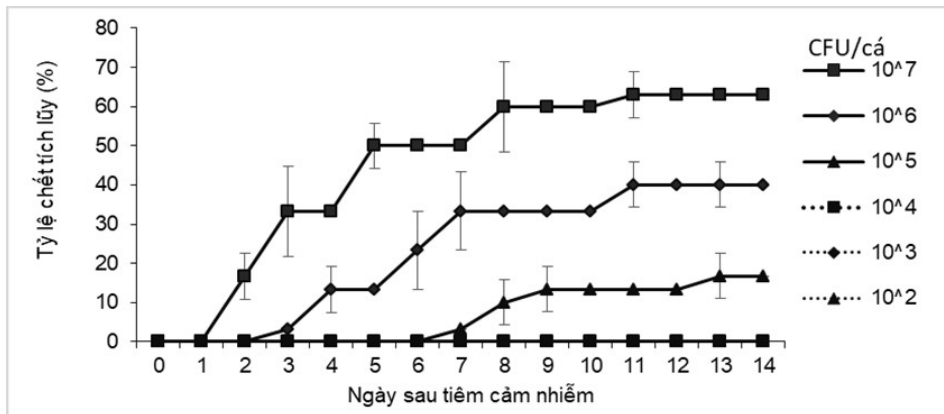
**Hình 4. Cá nheo Mỹ gây nhiễm thực nghiệm chủng vi khuẩn *E. ictaluri* NMHB-03.20**



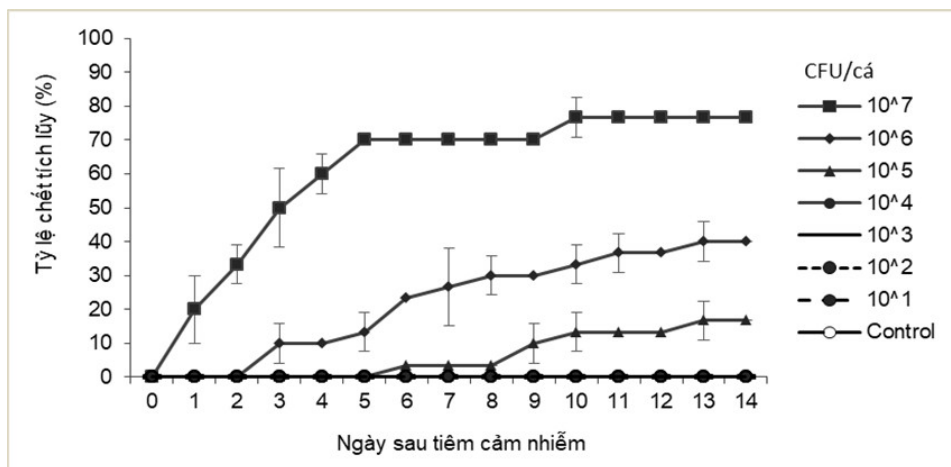
Ghi chú: A-C: Các đốm trắng hoại tử xuất hiện rõ trên lách và thận cá; D: vi khuẩn *E. ictaluri* nhuộm tươi trên mẫu thận cá.

**Hình 5. Cá rô phi gây nhiễm thực nghiệm chủng vi khuẩn *E. ictaluri* RPHB-02.20**

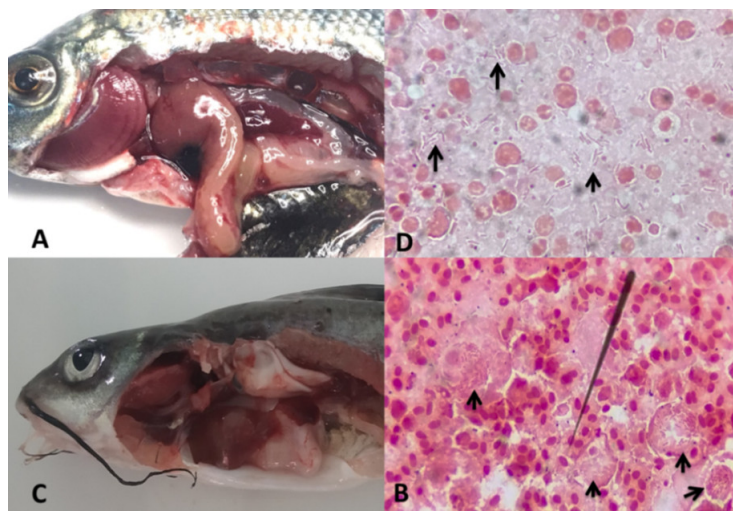




Hình 6. Kết quả gây nhiễm thực nghiệm chủng *E. ictaluri* NMHB-03.20 trên cá rô phi



Hình 7. Kết quả gây nhiễm thực nghiệm chủng *E. ictaluri* RPHB-02.20 trên cá nheo Mỹ



Ghi chú: Cá rô phi được gây nhiễm chủng vi khuẩn phân lập từ cá nheo Mỹ (A) và sự hiện diện của vi khuẩn *E. ictaluri* trong thận cá rô phi cảm nhiễm (B). Cá nheo Mỹ được gây nhiễm chủng vi khuẩn phân lập từ cá rô phi (C) và sự hiện diện của vi khuẩn *E. ictaluri* trong thận cá nheo Mỹ được cảm nhiễm (D)

Hình 8. Bệnh tích của cá được gây nhiễm chéo chủng vi khuẩn *E. ictaluri*

Như vậy, có thể thấy khi gây nhiễm chéo chủng vi khuẩn *E. ictaluri* liều cao có thể gây chết cho cá nheo Mỹ và rô phi trong điều kiện thực nghiệm. Tuy nhiên so với gây nhiễm trực tiếp, khi được gây nhiễm chéo cho kết quả khác biệt về liều gây chết LD<sub>50</sub>, độc lực và dấu hiệu lâm sàng của bệnh. Kết hợp các kết quả xác định đặc điểm sinh hóa, giám định bằng PCR và kết quả gây nhiễm chéo có thể kết luận rằng vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh ở cá nheo Mỹ và rô phi là có sự khác nhau về một số đặc tính sinh hóa, khả năng gây bệnh và bệnh tích gây ra trên từng loài cá. Sự suy giảm độc lực của vi khuẩn *E. ictaluri* khi được gây nhiễm sang loài cá ký chủ khác như giữa cá tra và cá điêu hồng hay từ cá nheo Mỹ sang cá rô phi đã được mô tả ở một số nghiên cứu trước đó. Kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả Nguyễn Thị Ngọc Huyền & Đặng Thị Hoàng Oanh (2020) trên chủng *E. ictaluri* phân lập từ cá điêu hồng bị bệnh gan thận mũ chỉ có khả năng gây bệnh ở cá điêu hồng mà không gây bệnh ở cá tra. Tương tự như vậy, nghiên cứu tại Mỹ của Plumb & Sanchez (1983) cho thấy chủng vi khuẩn *E. ictaluri* phân lập từ cá nheo Mỹ không gây chết cho cá rô phi xanh khi được cảm nhiễm, trừ khi sử dụng liều tiêm rất cao (10<sup>8</sup> CFU/cá). Kết quả nghiên cứu chúng tôi một lần nữa cung cấp minh chứng chứng minh rằng chủng vi khuẩn *E. ictaluri* từ cá rô phi có sự khác biệt với chủng gây bệnh ở cá nheo Mỹ. Nghiên cứu gần đây của Griffin & cs. (2016) cho thấy chủng vi khuẩn *E. ictaluri* có nguồn gốc từ ký chủ khác nhau thì có sự khác biệt về hệ gene, đây có thể là lý do chính làm cho mức độ độc lực suy giảm khi gây nhiễm chéo giữa các loài. Do vậy, cần có thêm các nghiên cứu tiếp theo để giải trình tự toàn bộ hệ gene của chủng *E. ictaluri* phân lập từ cá nheo Mỹ và rô phi phân lập được trong nghiên cứu này để tìm ra điểm khác biệt về hệ gene giữa chúng, thiết lập được các cặp môi đặc hiệu phục vụ chẩn đoán phân biệt chủng gây bệnh ở hai loài cá này.

Về mức độ lưu hành, theo kết quả của Nguyễn Trọng Nghĩa & Đặng Thị Hoàng Oanh (2019) khi cảm nhiễm chủng *E. ictaluri* phân lập từ cá điêu hồng có độc lực khá cao

(LD<sub>50</sub> = 4,7 × 10<sup>2</sup> CFU/cá) và gây ra các đốm hoại tử trên nội quan loài cá này với dấu hiệu bệnh lý tương tự như trên cá bệnh thu thập ở lồng bè nuôi ngoài thực địa ở một số tỉnh miền Nam. Kết hợp với kết quả thu mẫu và phân tích ở nhiều địa điểm khác nhau ở khu vực phía Bắc trong nghiên cứu này, có thể thấy rằng chủng *E. ictaluri* độc lực cao gây bệnh trên cá rô phi/điều hồng có thể đã lây lan và hiện diện tại nhiều vùng nuôi cá rô phi của Việt Nam. Do vậy, cần có các giải pháp ngăn chặn để hạn chế dịch bệnh bùng phát và giảm thiểu gây thiệt hại cho nghề nuôi cá rô phi, phục vụ phát triển bền vững loài nuôi này.

#### 4. KẾT LUẬN

Chủng *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh trên cá nheo Mỹ và cá rô phi khác nhau về một số đặc tính sinh hóa nhưng tương đồng về kết quả phân tích PCR khi sử dụng 2 cặp môi đặc hiệu phân tích giống *Edwardsiella* và loài *E. ictaluri* trên cá nheo Mỹ.

Giá trị LD<sub>50</sub> của chủng vi khuẩn phân lập từ cá rô phi và từ cá nheo Mỹ khi tiêm cho đúng loại ký chủ tương ứng ở mức 2,5-2,9 × 10<sup>1</sup> CFU/cá và 4,7-5,4 × 10<sup>3</sup> CFU/cá. Khi được gây nhiễm chéo, mức độ độc lực của các chủng vi khuẩn đều suy giảm lớn với giá trị LD<sub>50</sub> khi cảm nhiễm chủng phân lập cá nheo Mỹ cho rô phi và chủng phân lập từ rô phi cho cá nheo Mỹ tương ứng ở mức 2,51 × 10<sup>6</sup> CFU/cá và 1,99 × 10<sup>6</sup> CFU/cá. Với nồng độ gây nhiễm cao (10<sup>7</sup> CFU/cá) vẫn gây chết tỷ lệ cao (> 80%) trên loài cá được gây nhiễm chéo.

Kết quả nghiên cứu là thông tin cần thiết cho việc xây dựng kế hoạch, quy hoạch phát triển các mô hình nuôi trên sông, hồ chứa và định hướng phòng trị bệnh do vi khuẩn *E. ictaluri* gây ra trên cá nheo Mỹ và cá rô phi nuôi khi hai loài cá này đang được phát triển nuôi tập trung trên cùng một hệ thống mở như hiện nay.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện dưới sự tài trợ của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn

trong khuôn khổ dự án Worldbank với mã số đề tài ĐTKHCN.WB.11/20. Tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của các hộ nuôi cá nheo Mỹ và cá rô phi tại các tỉnh đã phối hợp thực hiện, tạo điều kiện thu mẫu để hoàn thành nghiên cứu này.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dong H.T., Senapin S., Jeamkunakorn C., Nguyen V.V., Nguyen N.T., Rodkhum C., Khunrae P. & Rattanaojpong T. (2019). Natural occurrence of edwardsiellosis caused by *Edwardsiella ictaluri* in farmed hybrid red tilapia (*Oreochromis* sp.) in Southeast Asia. *Aquaculture*. 499: 17-23.
- Griffin M., Reichley S., Greenway T., Quiniou S., Ware C., Gao D., Gaunt P., Yanong R., Pouder D. & Hawke J. (2016). Comparison of *Edwardsiella ictaluri* isolates from different hosts and geographic origins. *Journal of Fish Diseases*. 39(8): 947-969.
- Hawke J.P., Mcwhorter A.C., Steigerwalt A.G. & 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.
- Hoai T.D., Trang T.T., Van Tuyen N., Giang N.T.H. & Van Van K. (2019). *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in channel catfish in Vietnam. *Aquaculture*. 513: 734425.
- Kim Văn Vạn (2017). Xây dựng mô hình nuôi cá nheo mỹ (*Ictalurus punctatus*) trong ao tại Hưng Yên. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 15(6): 738-745.
- MARD (2019). Quy hoạch phát triển nuôi cá rô phi đến năm 2020, định hướng 2030. *Diễn đàn ứng dụng KHCN trong nuôi cá rô phi quy mô hàng hóa*, Hòa Bình, ngày 05/04/2019.
- Nguyễn Thị Ngọc Huyền & Đặng Thị Hoàng Oanh (2020). Đặc điểm bệnh học của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mù trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.). *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*. 56(1): 947-969
- Nguyễn Trọng Nghĩa & 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*. 55: 123-131
- Plumb J.A. & Sanchez D.J. (1983). Susceptibility of five species of fish to *Edwardsiella ictaluri*. *J. Fish Dis.* 6: 261-266.
- Reed L.J. & Muench H. (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology*. 27: 493-497
- Sakai T., Yuasa K., Sano M. & 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. *J. Aquat. Anim. Health*. 21: 124-132.
- Soto E., Griffin M., Arauz M., Riofrio A., Martinez A., & 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.
- Trương Đình Hoài, Kim Văn Vạn, Đào Lê Anh, Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Văn Tuyển, Vũ Đức Mạnh, Nguyễn Thị Hương Giang, Trương Quang Lâm & Nguyễn Thị Lan (2020). Đặc điểm bệnh lý và ứng dụng phương pháp PCR chẩn đoán bệnh gan thận mù trên cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 18(2): 94-104.