

Độc lực và ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường lên sự phát triển của *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá rô phi và biến đổi mô bệnh học trên cá nhiễm bệnh

Đoàn Thị Ninh^{1,2}, Vũ Đức Mạnh¹, Nguyễn Thị Hương Giang³, Đặng Thị Lệ², Trương Đình Hoài^{1*}

¹Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I

³Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 10/9/2021; ngày chuyển phản biện 15/9/2021; ngày nhận phản biện 13/10/2021; ngày chấp nhận đăng 18/10/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá độc lực, ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên sinh trưởng của *Aeromonas hydrophila* và biến đổi mô bệnh học trên cá rô phi. Các chủng vi khuẩn phân lập từ cá nghi nhiễm thu từ các ao/lồng nuôi ở một số tỉnh miền Bắc sau khi được định danh bằng phương pháp sinh hóa, PCR và phân tích trình tự gen đặc hiệu *16S rRNA*, *House keeping* (gen nội chuẩn - *gyrB*) được sử dụng để cảm nhiễm cho cá rô phi và đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường lên sự phát triển của chúng. Kết quả cho thấy, liều gây chết 50% (LD_{50}) cá thí nghiệm của *A. hydrophila* trung bình là $4,6 \times 10^5$ CFU/cá, cá cảm nhiễm thể hiện các dấu hiệu bệnh giống khi mắc bệnh tự nhiên (xuất huyết gốc vây, da, hậu môn, xuất huyết và tổn thương các nội quan như: gan, thận, lách, ruột). Các đặc điểm bệnh lý vi thể gồm mang tăng sinh, xuất huyết, mô nội quan như gan, thận, lách xung huyết, xuất huyết và thoái hóa, não xâm nhiễm vi khuẩn gây bệnh. Các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh trên cá rô phi có sức kháng rất mạnh với yếu tố bất lợi trong môi trường nuôi, chúng có thể tồn tại và phát triển ở khoảng nhiệt rộng (15-45°C), độ mặn 0-60‰, pH 5-10. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học nhằm xây dựng chiến lược và hỗ trợ công tác phòng chống dịch bệnh do *A. hydrophila* cho cá rô phi nói riêng và các loài cá nước ngọt nói chung.

Từ khóa: *Aeromonas hydrophila*, độc lực, mô bệnh học, rô phi, yếu tố môi trường.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Cá rô phi (*Oreochromis* spp.) là đối tượng ăn tạp, có khả năng chống chịu tốt với điều kiện mật độ nuôi cao, khoảng biến động rộng các yếu tố môi trường; dễ nuôi, chi phí nuôi thấp, đặc biệt thịt cá rô phi có màu trắng, ít xương dăm, phù hợp cho chế biến xuất khẩu và được thị trường ưa chuộng [1]. Theo báo cáo của FAO năm 2018, cá rô phi là đối tượng được nuôi rộng rãi ở khoảng 135 nước trên thế giới [2]. Tại Việt Nam, với lợi thế lớn về diện tích mặt nước, cá rô phi được định hướng phát triển thành loài nuôi chủ lực, ưu tiên mở rộng diện tích sản xuất, tạo thành các vùng nguyên liệu lớn như nuôi lồng ở các hồ chứa, lưu vực sông và phát triển nuôi thâm canh trong ao ở vùng đồng bằng để phục vụ chế biến và xuất khẩu. Mục tiêu đến năm 2030, diện tích vùng nuôi cá rô phi đạt 40.000 ha và 1,8 triệu m³ lồng với sản lượng đạt 400.000 tấn [3].

Vi khuẩn *Aeromonas* spp. phân bố ở nhiều hệ sinh thái khác nhau, thường được tìm thấy trong môi trường thủy sinh, nước ngọt, lợ, mặn, trong nước thải sinh hoạt, nước tưới thủy nông và các dạng thủy vực khác [4-6]. Nhiều loài vi khuẩn *Aeromonas* là tác nhân gây bệnh trên các đối tượng nuôi thủy sản [7]. Trong đó, *A. hydrophila* được xác định là tác nhân vi khuẩn thường gặp, gây thiệt hại kinh tế lớn cho ngành nuôi thủy sản, đặc biệt là với các mô hình nuôi thâm canh mật độ cao. Cá nhiễm bệnh thường có triệu chứng xuất huyết da, gốc vây và nội tạng, gây rối loạn chuyển hóa và nếu không có biện pháp phòng trị kịp thời tỷ lệ chết có thể ở mức

rất cao [8]. Trên thế giới, vi khuẩn *A. hydrophila* đã được báo cáo gây bùng phát bệnh trên cá rô phi ở nhiều nước như Iraq [9], Thái Lan [10], Ai Cập [11], Malaysia [12], Brazil [13], Trung Quốc [14].

Độc lực, tổn thương bệnh lý và tác động của các yếu tố môi trường lên sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn này là những thông tin quan trọng, là cơ sở khoa học cho việc xây dựng các phương pháp phòng và kiểm soát bệnh, tuy nhiên tại Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu chuyên sâu về các đặc tính của *A. hydrophila* gây bệnh trên cá rô phi. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, đánh giá độc lực của *A. hydrophila*, biến đổi mô bệnh học của cá nhiễm bệnh và ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường nuôi cấy lên sự phát triển của vi khuẩn này. Kết quả nghiên cứu cung cấp cơ sở khoa học để nâng cao hiệu quả phòng trị bệnh do *A. hydrophila* gây ra trên cá rô phi nói riêng và các loài cá nước ngọt nói chung.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Cá rô phi nghi nhiễm *A. hydrophila* (n=65) được thu ở một số vùng nuôi của 5 tỉnh Hải Dương (n=16), Bắc Ninh (n=12), Hòa Bình (n=18), Yên Bái (n=10) và Hà Nam (n=9) dùng để phân lập vi khuẩn gây bệnh. Vật liệu nghiên cứu chủ yếu bao gồm: cá rô phi khỏe mạnh cỡ 25-30 g mua từ Trại sản xuất giống ở Bắc Ninh để phục

*Tác giả liên hệ: Email: tdhoai@vnua.edu.vn

Examination of virulence and the effects of environmental conditions on the growth of *Aeromonas hydrophila* in farmed tilapia and histopathological changes in infected fish

Thi Ninh Doan^{1,2}, Duc Manh Vu¹,
Thi Huong Giang Nguyen³, Thi Lua Dang²,
Dinh Hoai Truong^{1*}

¹Faculty of Fisheries, Vietnam National University of Agriculture

²Research Institute for Aquaculture No. 1

³Faculty Veterinary Medicine, Vietnam National University of Agriculture

Received 10 September 2021; accepted 18 October 2021

Abstract:

The study aims to examine the pathogenicity, the effects of environmental conditions on the growth of *Aeromonas hydrophila* in tilapia, and histopathological changes in infected fish. *A. hydrophila* isolates, which were recovered from diseased tilapia samples collected at farming cages/ponds in several northern Vietnam provinces, were identified by biochemical tests, PCR confirmation, and sequencing of *16S rRNA* and housekeeping genes (*gyrB*). Three representative strains after identification were subjected to evaluate the pathogenicity via challenge experiments using the intraperitoneal injection method and to determine the impacts of environmental factors on their growth. The present study showed an average LD₅₀ value (lethal dose 50%) of *A. hydrophila* to tilapia at 4.6×10^5 CFU/fish, the infected fish in the challenge tests presented the clinical and gross lesions similar to the natural diseased fish, including haemorrhaging at the base of fins, skin, anal opening and in visceral organs, especially in liver and intestine. Histopathological examination of the diseased fish showed the hyperplasia of epithelial cells and haemorrhage of the gill filaments. The tissues of the liver, kidney, and spleen exhibited the lesion of haemorrhage, congestion, and degeneration, while the brain tissue appeared the colonisation by the bacteria. The *A. hydrophila* strains from tilapia showed a high tolerance to environmental conditions with the capacity to survive and multiply at a temperature of 15-45°C, a salinity of 0-60‰ and a pH of 5-10. The present results provide useful information to establish the strategies in prevention of *A. hydrophila* infection in tilapia and other freshwater fish.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, environmental condition, histopathology, tilapia, virulence.

Classification number: 4.5

vụ thí nghiệm cảm nhiễm; môi trường Tryptic soya broth, Tryptic soya agar (TSB và TSA, Merck), Rimler short (RS, HiMedia) phục vụ nuôi cấy, phân lập vi khuẩn. 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; hệ thống bể thí nghiệm và một số trang thiết bị, dụng cụ cần thiết khác.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu mẫu, nuôi cấy, phân lập vi khuẩn: cá nghi nhiễm *A. hydrophila* (xuất huyết da, gò vảy, mòn vảy) thu từ các ao nuôi đang bị bệnh được phân tích đặc điểm lâm sàng và bệnh tích đại thể. Vi khuẩn từ thận cá bệnh được rìa cấy trên môi trường TSA và nuôi cấy ở 28°C trong 24 giờ. Các mẫu vi khuẩn có hình dạng khuẩn lạc tròn, rìa đều, màu vàng bơ chiếm ưu thế được lựa chọn và tiến hành phân lập, nuôi cấy lặp lại 3 lần để thu chủng thuần. Các chủng được tiếp tục sàng lọc qua bước nuôi cấy trên môi trường RS, là môi trường chọn lọc *A. hydrophila*. Vi khuẩn được lưu giữ trong glycerol ở -80°C để sử dụng cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp định danh vi khuẩn bằng phản ứng sinh hóa: tổng số 45 chủng vi khuẩn phát triển tốt trên môi trường RS được lựa chọn ngẫu nhiên để đưa vào thử sinh hóa. Hình dạng vi khuẩn được quan sát sau nhuộm gram dưới kính hiển vi (100x), tính di động của vi khuẩn được soi tươi dưới kính hiển vi (100x); các phép thử catalase, oxidase và O/129 được thực hiện theo Abbott và cs (2003) [4]. Một số đặc tính sinh hóa khác được đánh giá bằng bộ kit API 20E theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Những chủng có kết quả thử sinh hóa trùng với chủng chuẩn *A. hydrophila* ATCC7966 được lựa chọn để đưa vào các bước định danh tiếp theo.

Phương pháp tách chiết DNA và giám định vi khuẩn gây bệnh bằng sinh học phân tử:

- Tách chiết DNA: những chủng vi khuẩn sơ bộ định danh là *A. hydrophila* qua phản ứng sinh hóa được sử dụng để tách chiết DNA. DNA của vi khuẩn được tách chiết bằng bộ kit InstaGene (Bio-Rad, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA vi khuẩn sau khi tách được lưu giữ trong điều kiện âm sâu (-20°C) phục vụ giám định vi khuẩn bằng PCR.

- Sàng lọc vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR: DNA của một số chủng vi khuẩn đại diện (n=5) đã được định danh sơ bộ bằng phản ứng sinh hóa được lựa chọn và tiếp tục sàng lọc bằng kỹ thuật PCR sử dụng primers đặc hiệu cho giống vi khuẩn *Aeromonas* và loài *A. hydrophila* (bảng 1). Hỗn dịch cho 1 phản ứng PCR có thể tích tổng 20 µl, bao gồm 10 µl Gotag green Master Mix (Promega), 1,5 µl mỗi primer xuôi và ngược, 3 µl mẫu DNA, 4 µl nước tách DNA. Hỗn dịch được đưa vào máy luân nhiệt để khuếch đại cho quá trình khếch đại DNA theo chu trình nhiệt như sau: tiền biến tính ở 95°C trong 4 phút; 35 chu kỳ lặp lại với biến tính ở 95°C trong 30s, gắn mồi ở 58°C trong 30s, kéo dài ở 72°C trong 60s; giai đoạn kéo dài sau cùng ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được phân tích trên máy điện di sử dụng bản gel chứa 1% agarose nhuộm bằng dung dịch Redsafe (Intron, Hàn Quốc). Hình ảnh điện di bản gel được chụp bằng hệ thống Gel imager (Bio-Rad, Mỹ).

Bảng 1. Các cặp mồi sử dụng để giải trình tự và giám định vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR.

Gen	Primers	Trình tự DNA (5'→3')	Kích cỡ sản phẩm (bp)	Nguồn
<i>16S rRNA</i> Universal bacteria ⁽¹⁾	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1500	[15]
	1525R	ACGGHTACCTTGTACGACTT		
<i>gyrB</i> ⁽¹⁾	gyrB 3F	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	1110	[16]
	gyrB 14R	TTGTCCGGGTGTACTCGTC		
<i>16S rRNA</i> ⁽²⁾	Aero16S-F	CTACTTTTGCCGGCGAGCGG	953	[17]
	Aero16S-R	TGATCCCCGAAGCACTCCC		
<i>AeroH</i> ⁽²⁾	AeroH-F	GAAAGGTGATGCCTAATACGTA	625	[18]
	AeroH-R	CGTGCTGGCAACAAGGACAG		

Ghi chú: ⁽¹⁾: primers sử dụng cho giải trình tự gen; ⁽²⁾: primers sử dụng cho quá trình giám định bằng PCR.

- Giải trình tự gen *16S rRNA*, House Keeping *gyrB* và xây dựng cây phả hệ: một số chủng vi khuẩn đại diện (n=3) có kết quả dương tính với cả 2 gen giống *Aeromonas* và loài *A. hydrophila* sau khi sàng lọc bằng PCR được gửi đi giải trình tự gen *16S rRNA* và *gyrB* tại Viện Gen và Công nghệ Sinh học (Biotec), Thái Lan. Trình tự các cặp mồi *16S rRNA* chung của vi khuẩn (27F/1525R, ~1500 bp) [15] và *gyrB* (*gyrB* 3F/*gyrB* 14R, 1110 bp) [16] được trình bày ở bảng 1.

Trình tự gen của các chủng vi khuẩn thu được được đối chiếu và so sánh mức độ tương đồng với trình tự của các chủng vi khuẩn chuẩn cùng giống *Aeromonas* và cùng loài chủng *A. hydrophila* ATCC7966 trên ngân hàng gen bằng Blast N algorithm. Tiến hành xây dựng cây phả hệ theo phương pháp Neighbor-joining [19] trên phần mềm Mega10 [20].

Đánh giá độc lực của vi khuẩn thông qua thí nghiệm cảm nhiễm: cá rô phi giống được nuôi thuần 1 tuần trong bể thể tích 500 l để làm quen với các điều kiện thí nghiệm. Các thông số môi trường được đảm bảo để không ảnh hưởng đến sức khỏe của cá trong thời gian nuôi thuần hóa. Cá được kiểm tra và xét nghiệm để đảm bảo khỏe mạnh trước khi tiến hành thí nghiệm. Ba chủng *A. hydrophila* giám định thành công được nuôi tăng sinh trong môi trường TSB. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy UV-Vis ở bước sóng 600 nm (OD₆₀₀) và phương pháp đếm trên đĩa thạch. Tiến hành điều chỉnh và pha loãng vi khuẩn bằng dung dịch PBS (Phosphate buffered saline) tạo thành dãy nồng độ 1×10⁷, 1×10⁶, 1×10⁵ và 1×10⁴ CFU/ml để sử dụng cho thí nghiệm cảm nhiễm.

Với mỗi chủng vi khuẩn, 270 cá khỏe mạnh được sử dụng để tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm, cá được bố trí vào các bể thể tích 100 l, mỗi bể 15 con. Cá cảm nhiễm được tiêm với lượng 0,1 ml dịch khuẩn tương ứng với các mức nồng độ vi khuẩn để tạo ra dãy nồng độ tiêm 1×10⁷, 1×10⁶, 1×10⁵, 1×10⁴, 1×10³ CFU/cá và 1 lô đối chứng được tiêm tương tự bằng PBS. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Cá được cho ăn bằng thức ăn công nghiệp và đảm bảo các điều kiện môi trường trong khoảng phù hợp cho cá sinh trưởng, như nhiệt độ 25-30°C, pH 7-8, DO>5 mg/l, TAN<1 mg/l. Cá sau tiêm được theo dõi trong 14 ngày, hàng ngày quan sát và ghi chép số lượng cá chết. Các mẫu cá mới chết hoặc sắp chết được sử dụng để tái phân lập

và định danh lại tác nhân gây bệnh và thu mẫu để đánh giá biến đổi mô học. Dựa vào số tỷ lệ cá chết, liều gây chết 50% cá thí nghiệm (LD₅₀) được tính theo công thức của Reed và Muench (1938) [21] như sau:

$$LD_{50} = 10^{(a-x)}$$

trong đó: a là nồng độ (số lữ thừa) mà tại đó vi khuẩn gây chết cá thấp nhất (trên 50%); x được tính theo công thức: $x = (P_a - 50) / (P_a - P_u)$, với P_a, P_u là tỷ lệ cận trên và cận dưới của nồng độ gây chết 50%.

Phương pháp làm tiêu bản mô học và xác định biến đổi mô học: tổng số 15 mẫu cá sắp chết và có dấu hiệu xuất huyết nặng trong quá trình cảm nhiễm và 2 mẫu cá khỏe mạnh ở lô đối chứng được sử dụng để thu mẫu mô mang, lách, thận, gan, ruột và não. Các mẫu mô được cố định trong buffer formalin 10%, sau đó được đúc parafin, cắt thành các tiêu bản có độ dày <5 μm, nhuộm bằng thuốc hematoxylin và eosin (H&E) theo quy trình nghiên cứu mô bệnh học được mô tả bởi [22, 23]. Các biến đổi bệnh lý vi thể trên các tiêu bản được đánh giá bằng kính hiển vi với các độ phóng đại khác nhau (x10, x40, x100).

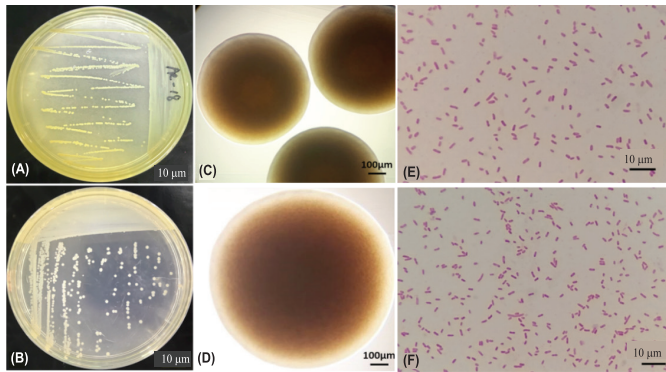
Đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ, độ muối và pH lên sinh trưởng của vi khuẩn: ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy bao gồm nhiệt độ, độ muối và pH lên quá trình sinh trưởng của vi khuẩn được đánh giá đối với 3 chủng vi khuẩn đã sử dụng để cảm nhiễm. Để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ, tiến hành nuôi cấy vi khuẩn ở các khoảng nhiệt độ 10, 15, 20, 25, 28, 30, 35, 40 và 45°C sử dụng thiết bị nuôi cấy có điều chỉnh nhiệt độ. Với độ mặn, bổ sung NaCl vào môi trường nuôi cấy để đạt được các mức độ mặn thử nghiệm 0, 20, 40, 50, 55, 60 và 65‰. Đối với pH, môi trường nuôi được điều chỉnh bằng NaOH 1 M và HCl 1 M để đạt được các ngưỡng pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 9,5 và 10. Mỗi yếu tố thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại. Các mức môi trường thí nghiệm được lựa chọn và thiết lập dựa trên các thử nghiệm sơ bộ của nhóm nghiên cứu (số liệu không trình bày) và kết quả công bố của Palumbo và cs (1985) [24]. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường tăng sinh TSB với các mức nhiệt độ, độ muối và pH đã thiết kế và theo dõi sinh trưởng thông qua giá trị đo mật độ quang OD₆₀₀ sau 24 giờ nuôi cấy. Đối với các lô thử nghiệm độ mặn và pH, vi khuẩn được nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ phù hợp là 28°C.

Phương pháp phân tích số liệu: số liệu tỷ lệ chết theo ngày của cá ở các lô cảm nhiễm được phân tích thống kê mô tả lấy giá trị trung bình, độ lệch chuẩn (SD). Kết quả đo mật độ quang OD₆₀₀ của dịch khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy được đánh giá bằng phân tích thống kê, kết hợp với so sánh giữa các nghiệm thức bằng phân tích ANOVA, sử dụng phép so sánh Turkey Post-Hoc trên phần mềm SPSS20 và Excel 2013.

Kết quả và bàn luận

Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn *A. hydrophila*

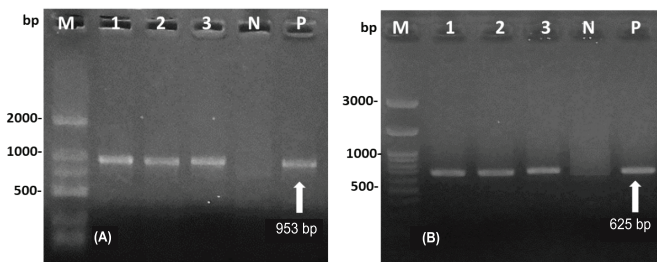
Quá trình nuôi cấy và phân lập vi khuẩn từ cá rô phi nghi nhiễm *A. hydrophila* thu ở các ao nuôi tại Hải Dương, Hà Nam, Hòa Bình, Bắc Ninh, Yên Bái thu được 45 chủng thuần trên môi trường RS với khuẩn lạc có hình tròn, rìa bằng hơi lồi, màu vàng nhạt, đường kính 1,2-1,5 mm, vi khuẩn bắt màu gram âm, hình que ngắn, tròn 2 đầu, kích cỡ 1,5-2,5 μm (hình 1).



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và hình dạng vi khuẩn *A. hydrophila* khi nuôi cấy trên môi trường RS (A, C, E) và trên TSA (B, D, F) sau 24 giờ ở nhiệt độ 28°C.

Tất cả 45 chủng phát triển trên môi trường RS được đưa vào thử một số đặc tính sinh hóa, kết quả thu được 22/45 chủng có các đặc tính sinh hóa trùng với chủng chuẩn *A. hydrophila* ATCC7966 như có khả năng di động, dương tính với các phép thử oxidase, catalase, sinh citrate, indol, H₂S và âm tính với các phép thử sinh urea, inositol, sorbitol được định danh sơ bộ là *A. hydrophila* (bảng 2). Như vậy, 23 chủng phát triển trên môi trường RS còn lại không có các đặc tính sinh hóa tương đồng với vi khuẩn *A. hydrophila*. Trong những năm gần đây, các loài *Aeromonas* ngày càng được định danh chi tiết thành các nhóm dưới loài, do vậy nhiều loài *Aeromonas* sp. có thể phát triển trên môi trường RS và cùng có chung một số đặc tính sinh hóa nhất định nhưng thuộc loài khác nhau, chính vì vậy việc định danh loài trong nhóm vi khuẩn *Aeromonas* được khuyến cáo bổ sung sàng lọc bằng kỹ thuật PCR trước khi giải trình tự và phân tích cây phả hệ các gen *16S rRNA* và *gyrB* so với chủng chuẩn [4, 25].

Từ 22 chủng định danh sơ bộ là *A. hydrophila* qua các đặc điểm sinh hóa, 5 chủng vi khuẩn đại diện đã được lựa chọn ngẫu nhiên để tiếp tục sàng lọc bằng kỹ thuật PCR và thu được 3 chủng có kết quả dương tính với cả 2 cặp môi sử dụng để định danh giống *Aeromonas* (hình 2A) và gen loài *A. hydrophila* (hình 2B).

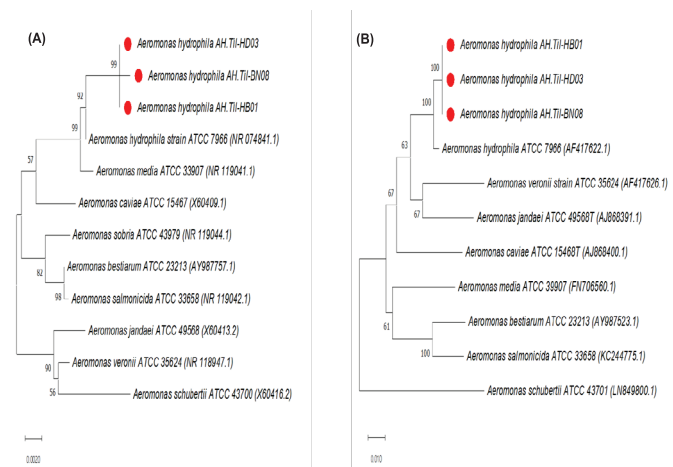


Hình 2. Kết quả sàng lọc bằng PCR một số chủng vi khuẩn sử dụng 2 cặp môi đặc hiệu cho giống *Aeromonas* (953 bp, A) và đặc hiệu cho loài vi khuẩn *A. hydrophila* (625 bp, B). M: marker; giếng 1-3: 3/5 chủng vi khuẩn dương tính; N: đối chứng âm (nước muối sinh lý); P: đối chứng dương - chủng chuẩn *A. hydrophila* ATCC7966.

Kết quả phân tích tương đồng về trình tự gen và lập cây phả hệ cho thấy, gen *16S rRNA* và *gyrB* của 3 chủng vi khuẩn đại diện sau sàng lọc bằng sinh hóa và PCR đều có sự tương đồng cao với gen *16S rRNA* và *gyrB* chủng chuẩn *A. hydrophila* ATCC7966, tỷ lệ tương đồng của gen *16S rRNA* là 99,48-99,61% và *gyrB* là 99,1-99,2% (hình 3).

Bảng 2. Đặc điểm hình thái, sinh hóa các chủng vi khuẩn sơ bộ định danh là *A. hydrophila* phân lập được (n=22).

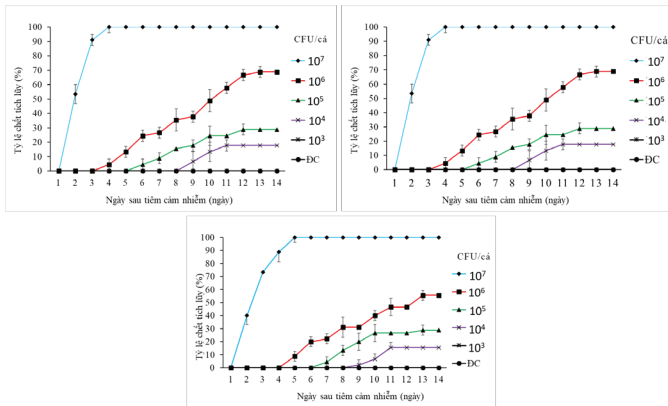
Đặc điểm sinh hóa	Các chủng nghi <i>A. hydrophila</i> phân lập được (n=22)	<i>A. hydrophila</i> ATCC7966
Gram	-	-
Hình dạng	Que ngắn	Que ngắn
Di động	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
O/129 test	-	-
β-galactosidase (ONPG)	+	+
Arginine dihydrolase (ADH)	+	+
Lysine decarboxylase (LDC)	+	-
Omithine decarboxylase (ODC)	-	-
Citrate utilisation (CIT)	+	+
H ₂ S production (H ₂ S)	+	+
Urease (URE)	-	-
Indole production (IND)	+	+
Voges-Proskauer (VP)	+	+
Gelatinase (GEL)	+	+
Acid production		
Glucose (GLU)	+	+
Mannitol (MAN)	+	+
Inositol (INO)	-	-
Sorbitol (SOR)	-	-
Rhamnose (RHA)	Dao động	Dao động
Melibiose	-	-
Sucrose (SAC)	+	+
Amygdalin	-	-
Arabinose (ARA)	+	-



Hình 3. Kết quả phân tích cây phả hệ dựa trên trình tự gen *16S rRNA* (A) và *gyrB* (B) của 3 chủng đại diện được lựa chọn sau khi sàng lọc bằng sinh hóa và PCR so với các loài *Aeromonas* khác từ dữ liệu Genbank sử dụng phương pháp Neighbour-joining, bootstraps 1000 lần lặp.

Kết quả đánh giá độc lực của vi khuẩn *A. hydrophila* thông qua cảm nhiễm

Thử nghiệm cảm nhiễm được thực hiện trên 3 chủng vi khuẩn AH.Til-HB01, AH.Til-HD03 và AH.Til-BN08 đã được định danh thành công bằng sinh hóa, PCR và giải trình tự gen. Kết quả thí nghiệm cho thấy, xu hướng gây chết cá thí nghiệm khi cảm nhiễm bằng 3 chủng vi khuẩn diễn ra ở các nồng độ tiêm tương đối giống nhau. Ở nồng độ tiêm cao nhất (10^7 CFU/cá), cá chết nhanh sau khi tiêm, tỷ lệ chết dao động từ 40,0 đến 72,2% ngay sau 24 giờ tiêm và chết hoàn toàn sau 3-4 ngày tiêm mà không xuất hiện dấu hiệu bệnh tích rõ ràng. Ở nồng độ tiêm thấp hơn (10^6 CFU/cá), cá chết chậm hơn, bắt đầu chết sau 4-5 ngày tiêm và tăng dần đến mức 55,6-68,9% sau 14 ngày gây nhiễm. Ở nồng độ tiêm 10^5 và 10^4 CFU/cá, tỷ lệ chết tương ứng chỉ ở mức 28,9-35,6% và 15,6-17,8% trong khi không có cá chết trong lô tiêm liều 10^3 CFU/cá và lô đối chứng tiêm PBS. Giá trị LD_{50} của 3 chủng tiêm gây nhiễm AH.Til-HB01, AH.Til-HD03 và AH.Til-BN08 tương ứng ở mức $4,5 \times 10^5$, $3,4 \times 10^5$ và $6,2 \times 10^5$ CFU/cá, trung bình đạt $4,6 \times 10^5$ CFU/cá (hình 4).



Hình 4. Biến động tỷ lệ cá rô phi chết sau cảm nhiễm bằng 3 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* là A-AH.Til-HB01, B-AH.Til-HD03, C-AH.Til-BN08.

Các lô thí nghiệm với liều tiêm 10^4 - 10^6 CFU/cá xuất hiện dấu hiệu lâm sàng và bệnh tích tương đồng với cá nhiễm bệnh ngoài tự nhiên như xuất huyết gốc vây, xương nắp mang, xuất huyết cục bộ trên da. Nhiều mẫu cá nhiễm bệnh có dấu hiệu sưng, trướng bụng do tăng sinh dịch trong ổ bụng. Bệnh tích đại thể như xuất huyết nội tạng đặc biệt ở gan, ruột hay hiện tượng sưng, tăng kích cỡ nội tạng như gan, mật là các đặc điểm hoàn toàn tương đồng với cá bị nhiễm bệnh *A. hydrophila* thu từ ao/lồng nuôi. Kết quả nuôi cấy, giám định lại bằng PCR một số chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu cá chết trong quá trình cảm nhiễm đều cho kết quả vi khuẩn *A. hydrophila*.

Như vậy, nghiên cứu đặc tính độc lực khẳng định cá rô phi mẫn cảm với vi khuẩn *A. hydrophila* khi được cảm nhiễm qua con đường tiêm và tỷ lệ chết của cá phụ thuộc vào nồng độ tiêm. Trong nghiên cứu, giá trị LD_{50} trung bình xác định được ở mức $4,6 \times 10^5$ CFU/cá, cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Pauzi và cs (2020) [12] thử nghiệm trên cá điêu hồng ($1,1 \times 10^4$ CFU/cá). Sự khác biệt về liều gây chết LD_{50} có thể do sự khác biệt về đặc tính độc lực giữa các chủng vi khuẩn, tuổi của cá thí nghiệm và các yếu tố gây stress ảnh hưởng trong quá trình thí nghiệm và chăm sóc cá [26]. Tuy nhiên, đối với *A. hydrophila*, liều gây chết $4,6 \times 10^5$ CFU/cá cũng được coi



Hình 5. Dấu hiệu lâm sàng và triệu chứng bệnh tích trên cá nhiễm *A. hydrophila* tự nhiên (A1, A2, B1, B2) và từ cá cảm nhiễm (C1, C2, D1, D2) với biểu hiện xuất huyết gốc vây, xương nắp mang, hậu môn, xuất huyết nội quan như gan, ruột (mũi tên đỏ).

là khá cao khi so sánh với một số nghiên cứu trên ký chủ khác như cá quả là 1×10^8 CFU/cá [27] và cá sặc là $4,53 \times 10^6$ CFU/cá [28]. Hiện tượng cá rô phi thí nghiệm chết nhanh khi sử dụng liều tiêm có nồng độ vi khuẩn cao quan sát được trong nghiên cứu có thể do hàm lượng cao của một số loại độc tố do vi khuẩn tiết ra gây độc, gây chết cấp tính khi chưa thể hiện rõ dấu hiệu lâm sàng của bệnh. Hiện tượng cá cảm nhiễm chết cấp tính cũng đã được báo cáo ở một số nghiên cứu trước đây khi sử dụng liều gây nhiễm ở mật độ vi khuẩn cao [26, 29]. Kết quả cảm nhiễm trong nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy sử dụng liều tiêm nồng độ thấp (10^4 - 10^6 CFU/cá), cá thí nghiệm sẽ xuất hiện triệu chứng và bệnh tích xuất huyết điển hình của bệnh.

Đặc điểm mô bệnh học của cá nhiễm *A. hydrophila*

Kết quả đánh giá các tổn thương bệnh lý vi thể từ mẫu mô mang, gan, thận, lách, ruột và não của 15 mẫu cá cảm nhiễm *A. hydrophila* ở các nồng độ tiêm 10^4 - 10^6 CFU/cá được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Bệnh tích vi thể của cá rô phi cảm nhiễm với *A. hydrophila* (n=15*).

Cơ quan	Biến đổi bệnh lý vi thể					
	Xung huyết	Xuất huyết	Tụ huyết	Tăng sinh	Thoái hóa	Hoại tử
Mang	15	15	-	13	8	-
Gan	15	15	13	-	6	-
Lách	-	-	10	-	-	-
Thận	-	9	6	-	5	-
Ruột	15	15	13	8	6	-
Não	12	3	-	-	-	-

*: tổng 45 tiêu bản với mỗi cơ quan đánh giá ở 3 tiêu bản ở 3 vị trí khác nhau; (-): không xuất hiện.

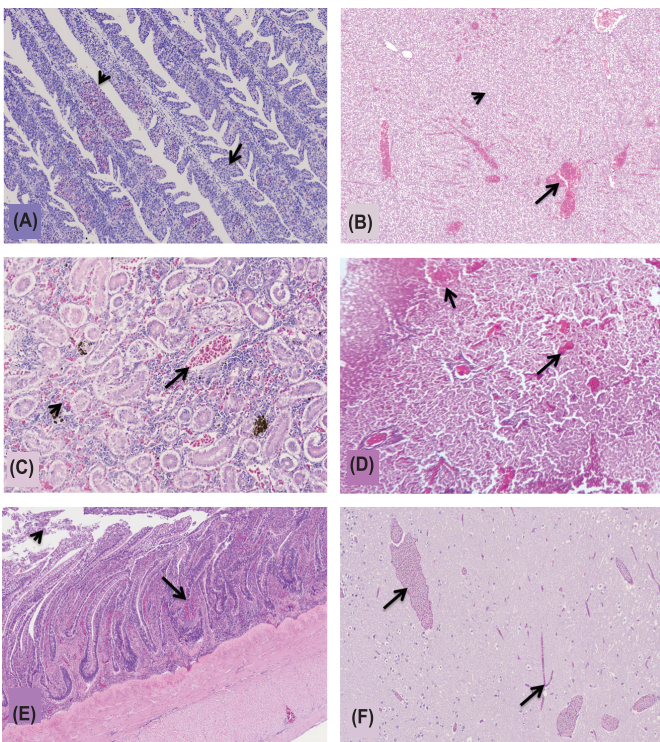
Kết quả kiểm tra tiêu bản mô học cho thấy, biến đổi chủ yếu trên mô mang cá nhiễm *A. hydrophila*, bao gồm xung huyết, xuất huyết và tăng sinh tế bào biểu mô mang và tế bào nhày, dẫn đến các tia mang thứ cấp dính, vón vào nhau (hình 6A). Hiện tượng này làm giảm diện tích tiếp xúc giữa các tia mang và môi trường nước, giảm khả năng trao đổi khí giữa cơ thể và môi trường nước bên ngoài, dẫn đến cá thiếu oxy, cá bệnh thường bơi lơ lờ và ngáp khí. Mô gan cá nhiễm bệnh có hiện tượng xung huyết và xuất huyết khá nghiêm trọng, ngoài ra một số mẫu có kèm theo hiện tượng thoái hóa dạng không bào (hình 6B). Thận cá xuất huyết, tụ huyết và một số cá bắt đầu có hiện tượng thoái hóa nhu mô thận (hình 6C). Lách là cơ quan tạo máu chính của cá, khi cá nhiễm *A. hydrophila* thường có lách sưng to và tụ máu (hình 6D). Ruột là nơi có biểu hiện rõ nhất, thành ruột xuất huyết nặng, một số mẫu thành ruột mỏng nhưng một số có hiện tượng tăng sinh biểu mô (hình 6E). Não cá có sự thâm nhiễm của vi khuẩn gây bệnh, hiện tượng xung huyết não cũng thường được bắt gặp trên các mẫu cá nhiễm *A. hydrophila* (hình 6F).

Hiện tượng xuất huyết các cơ quan là dấu hiệu thường gặp khi cá bị nhiễm *A. hydrophila* và được cho là do phản ứng gây viêm cấp tính của ký chủ với mầm bệnh. Vi khuẩn *Aeromonas* có khả năng sản sinh ra nhiều dạng độc tố và chất tiết ngoại bào, đóng vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhiễm và gây bệnh trên ký chủ [30]. Khả năng tiết các enzyme gây tan máu là đặc trưng ở giống vi khuẩn *Aeromonas*, trong đó có *A. hydrophila* với 3 dạng đã được xác định [31]. Aerolysin là protein làm thay đổi khả năng thẩm thấu của tế bào máu khi được gắn lên các vị trí glycoprotein đặc hiệu trên màng

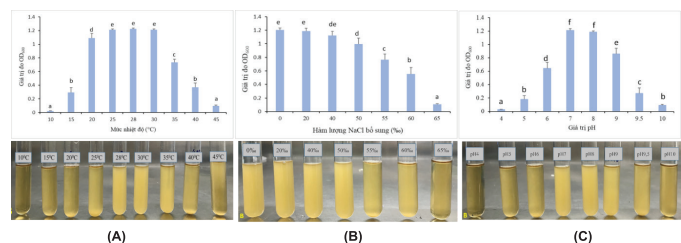
tế bào, thúc đẩy phân rã tế bào do mất cân bằng áp suất thẩm thấu [32]. Hai dạng khác bao gồm β -hemolysin, yếu tố gây dung huyết hồng cầu hoàn toàn và α -hemolysin gây dung huyết hồng cầu từng phần [33]. Các gen mã hóa cho các protein gây tan huyết đã được xác định có mặt trong hầu hết các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập trên cá nheo mỹ và cá hồi nhiễm bệnh [34, 35]. Khi vi khuẩn tiết ra cá sản phẩm độc tố này sẽ gây phá vỡ các mao mạch nhỏ, quá trình nhân lên của vi khuẩn càng nhiều theo diễn biến của bệnh, tình trạng xuất huyết sẽ thể hiện rõ hơn, tạo thành các khối viêm trên da, cá dần thiếu máu, bỏ ăn, bơi lơ lờ và nhiễm trùng huyết [36].

Ảnh hưởng của nhiệt độ, độ mặn và pH lên sinh trưởng của vi khuẩn *A. hydrophila*

Vi khuẩn *A. hydrophila* thể hiện khả năng sống sót và phát triển tốt ở dải nhiệt độ khá rộng (hình 7A). Vi khuẩn phát triển tốt nhất ở khoảng nhiệt độ 25-30°C. Khi nằm ngoài khoảng nhiệt độ tối ưu này, vi khuẩn có xu hướng phát triển chậm hơn rõ rệt ($p < 0,05$). Mức nhiệt độ $< 10^\circ\text{C}$ và $> 45^\circ\text{C}$, vi khuẩn hầu như không phát triển. Đối với độ mặn, vi khuẩn *A. hydrophila* có khả năng phát triển tốt và sống sót được trong khoảng độ mặn rộng ở nhiệt độ nuôi cấy 28°C. Khi được nuôi cấy trong môi trường tăng sinh bổ sung NaCl ở nồng độ 0, 20 và 40‰, vi khuẩn đều phát triển tốt và đạt mật độ tương đương nhau với các giá trị đo OD₆₀₀ tương ứng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Khi tiếp tục tăng độ mặn, khả năng sinh trưởng của vi khuẩn suy giảm, tuy nhiên vi khuẩn vẫn thể hiện khả năng nhân lên chậm ở độ mặn 60‰ và tồn tại mà không phát triển ở độ mặn 65‰ (hình 7B). Đối với pH, vi khuẩn *A. hydrophila* phát triển tốt ở khoảng pH 6-9 và tối ưu ở môi trường có pH 7-8 khi nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C. Tuy nhiên, khi pH tăng lên đến 9,5 thì giá trị OD₆₀₀ giảm xuống rất thấp (OD₆₀₀=0,267). Ở mức pH 4 và 10, vi khuẩn vẫn tồn tại và nhân lên nhưng với mức độ rất kém (hình 7C).



Hình 6. Biến đổi mô bệnh học của cá rô phi cảm nhiễm *A. hydrophila*. (A) Mang tăng sinh, xuất huyết; (B) Gan xuất huyết, thoái hóa không bào; (C) Thận xuất huyết, tụ huyết; (D) Lách tụ máu; (E) Ruột xuất huyết, tăng sinh biểu mô; (F) Não thâm nhiễm nhiều vi khuẩn gây bệnh, xung huyết.



Hình 7. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ (A), độ mặn (B) và pH (C) của môi trường nuôi cấy lên sinh trưởng, phát triển của *A. hydrophila* gây bệnh ở cá rô phi.

Trong nghiên cứu này, mức độ sinh trưởng, phát triển của vi khuẩn *A. hydrophila* tương đương nhau ở khoảng nhiệt độ 25-30°C và có sự suy giảm ở nhiệt độ 20°C, tương đồng với kết quả báo cáo ở một số nghiên cứu trước đó [19, 24]. Nhóm nghiên cứu Palumbo và cs (1985) [24] ghi nhận mức nhiệt 10°C vi khuẩn *A. hydrophila* vẫn tồn tại nhưng phát triển yếu sau 24 giờ nuôi cấy, tuy nhiên ở 12°C, vi khuẩn có thể phát triển và nhân lên sau 72-96 giờ nuôi cấy. Điều này cho thấy, vi khuẩn *A. hydrophila* có khả năng chống chịu và thích nghi tốt khi các điều kiện môi trường nuôi thay đổi. Ngoài ra, các điều kiện môi trường phù hợp cho sinh trưởng và

phát triển của động vật thủy sản nói chung và cá rô phi nói riêng (nhiệt độ 25-30°C, pH 6-8) cũng là khoảng môi trường phù hợp cho quá trình nhân lên của loài tác nhân gây bệnh này. Khi nhiệt độ tăng cao sẽ là điều kiện cho mầm bệnh phát triển và gây bệnh, do vậy sát trùng định kỳ trong quá trình nuôi là một trong những giải pháp để quản lý mật độ vi khuẩn và ngăn ngừa bệnh xảy ra, đặc biệt là thời điểm giao mùa vụ xuân hè.

KẾT LUẬN

Liều gây chết 50% của vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá rô phi phân lập ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam là khá cao, trung bình LD₅₀ là 4,6×10⁵ CFU/cá. Vi khuẩn *A. hydrophila* gây ra các tổn thương bệnh lý vi thể đặc trưng là xuất huyết ở mang và hầu hết các nội quan, đặc biệt là gan và ruột. Vi khuẩn *A. hydrophila* có sức kháng cao với các yếu tố môi trường, khả năng tồn tại ở các điều kiện bất lợi về nhiệt độ (15-45°C), pH (5-10) và độ mặn (0-60‰). Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin và cơ sở khoa học để xây dựng các giải pháp phòng chống dịch bệnh do *A. hydrophila* trên cá rô phi nói riêng và các loài cá nước ngọt nói chung.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ từ Chương trình Aus4Skills cho các cựu lưu học sinh từ Chính phủ Úc. Đồng thời, tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của các nhóm sinh viên, học viên cao học Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, các chủ trang trại nuôi cá ở Hải Dương, Bắc Ninh, Hòa Bình, Yên Bái và Hà Nam đã tạo điều kiện trong quá trình điều tra, thu mẫu phục vụ nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] W. Surachetpong, et al. (2020), "Tilapia lake virus: the story so far", *Journal of Fish Diseases*, **43**(10), pp.1115-1132.

[2] FAO (2018), *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018*, Meeting the Sustainable Development Goals.

[3] MARD (2019), *Decision to Approve the Plan of Tilapia Farming Development by 2020, Driven by 2030*.

[4] S.L. Abbott, et al. (2003), "The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes", *Journal of Clinical Microbiology*, **41**(6), pp.2348-2357.

[5] A. Ali (1996), "*Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genomospecies DNA group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non-human sources", *Med. Microbiol. Lett.*, **5**, pp.156-165.

[6] P. Monfort, B. Baleux (1990), "Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond", *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(7), pp.1999-2006.

[7] R. Beaz-Hidalgo, et al. (2010), "Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish", *Systematic and Applied Microbiology*, **33**(3), pp.149-153.

[8] A. Laith, M. Najiah (2014), "*Aeromonas hydrophila*: antimicrobial susceptibility and histopathology of isolates from diseased catfish, *clarias gariepinus* (Burchell)", *Journal of Aquaculture Research and Development*, **5**(2), DOI: 10.4172/2155-9546.1000215.

[9] S.A. AlYahya, et al. (2018), "Histopathological studies of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blue tilapia, *Oreochromis aureus*", *Saudi Journal of Biological Sciences*, **25**(1), pp.182-185.

[10] P. Nicholson, et al. (2020), "Coinfection of tilapia lake virus and *Aeromonas hydrophila* synergistically increased mortality and worsened the disease severity in tilapia (*Oreochromis spp.*)", *Aquaculture*, **520**, pp.734-746.

[11] H.M. Abdel-Latif, A.F. Khafaga (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), pp.1880-1892.

[12] N.A. Pauzi, et al. (2020), "Antibiotic susceptibility and pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* isolated from red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*) in Malaysia", *Veterinary World*, **13**(10), pp.2166-2171.

[13] A. El-Ashram (2002), "On *Aeromonas hydrophila* infection among cultured tilapias: a biological, histopathological and management study", *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, **6**(3), pp.181-202.

[14] J. Li, et al. (2011), "Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish", *Journal of Applied Microbiology*, **110**(3), pp.823-830.

[15] W.G. Weisburg, et al. (1991), "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of Bacteriology*, **173**(2), pp.697-703.

[16] M. Yanez, et al. (2003), "Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**(3), pp.875-883.

[17] C. Lee, et al. (2002), "Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm", *Appl. Microbiol.*, **93**, pp.976-985.

[18] M.E. Nielsen, et al. (2001), "Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang province of China?", *Dis. Aquat. Organ.*, **46**, pp.23-29.

[19] N. Saitou, M. Nei (1987), "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees", *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4), pp.406-425.

[20] S. Kumar, et al. (2018), "MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms", *Molecular Biology and Evolution*, **35**(6), pp.1547-1549.

[21] L.J. Reed, H. Muench (1938), "A simple method of estimating fifty per cent endpoints", *American Journal of Epidemiology*, **27**(3), pp.493-497.

[22] Trương Đình Hoài và cs (2014), "Đặc điểm mô bệnh học của cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) nhiễm *Streptococcus* sp. nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **12**(3), tr.360-371.

[23] Trương Đình Hoài và cs (2015), "Nghiên cứu đặc điểm mô bệnh học mang cá trắm cỏ", *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **13**(1), tr.38-48.

[24] S. Palumbo, et al. (1985), "Influence of temperature, NaCl, and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*", *Journal of Food Science*, **50**(5), pp.1417-1421.

[25] J.M. Janda, S.L. Abbott (2010), "The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection", *Clinical Microbiology Reviews*, **23**(1), pp.35-73.

[26] H.T. Dong, et al. (2017), "*Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)", *Journal of Fish Diseases*, **40**(10), pp.1395-1403.

[27] V. Samayanpaulraj, V. Velu, R. Uthandakalaipandian (2019), "Determination of lethal dose of *Aeromonas hydrophila* Ah17 strain in snake head fish *Channa striata*", *Microbial Pathogenesis*, **127**, pp.7-11.

[28] K. Rahayu, D. Daruti, M. Stella (2018), "Study on characterization, pathogenicity and histopathology of disease caused by *Aeromonas hydrophila* in gourami (*Osphronemus gouramy*)", *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **137**(1), pp.1-9.

[29] H.T. Dong, et al. (2015), "Naturally concurrent infections of bacterial and viral pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms", *Aquaculture*, **448**, pp.427-435.

[30] R. Beaz-Hidalgo, M. Figueras (2013), "*Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease", *Journal of Fish Diseases*, **36**(4), pp.371-388.

[31] J.M. Pemberton, S.P. Kidd, R. Schmidt (1997), "Secreted enzymes of *Aeromonas*", *FEMS Microbiology Letters*, **152**(1), pp.1-10.

[32] S.P. Howard, J.T. Buckley (1985), "Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing", *Journal of Bacteriology*, **163**(1), pp.336-340.

[33] C. Xia, et al. (2004), "PCR cloning and identification of the β-haemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fishes in China", *Aquaculture*, **229**(1-4), pp.45-53.

[34] M. Nawaz, et al. (2010), "Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish", *Food Microbiology*, **27**(3), pp.327-331.

[35] I.Y. Nam, K.S. Joh (2007), "Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by hexaplex-PCR", *Journal of Microbiology*, **45**(4), pp.297-304.

[36] P.T. Woo, D.W. Bruno (2011), *Fish Diseases and Disorders: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, CABI.