

PHÂN LẬP, XÁC ĐỊNH TÍNH KHÁNG NGUYÊN VÀ ĐỘC LỰC CỦA CÁC CHỦNG *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* GÂY BỆNH Ở CÁ RÔ PHI TẠI 7 TỈNH, THÀNH TRONG CẢ NƯỚC

**Hồ Thu Thủy¹, Vũ Đức Hạnh³,
Nguyễn Bá Tiếp³, Nguyễn Việt Không², Lại Thị Lan Hương³**

TÓM TẮT

Kết quả phân lập và xác định tính kháng nguyên, độc lực của các chủng vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây bệnh ở cá rô phi tại 7 tỉnh/thành: Hà Nội, Hải Dương, Quảng Ninh, Đồng Tháp, Tiền Giang, Vĩnh Long, An Giang cho thấy tỷ lệ mẫu bệnh phân lập được vi khuẩn *Streptococcus* spp. là 96%. Trong số 296 chủng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập được, các chủng: NS5; NS13; LX7; LX8; LX9; LX10; ĐN8; ĐN9; ĐN10; ĐN12; ĐN17; O2; TP3; TP4 có tính kháng nguyên. Độc lực của các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* (TP4; O2; ĐN12; LX8 và NS5) là rất mạnh.

Từ khóa: Cá rô phi, vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*, kháng nguyên, độc lực.

Isolation, virulence and antigen determination of *Streptococcus agalactiae* strains caused disease in Tilapia at 7 provinces of Viet Nam

**Ho Thu Thuy, Vu Duc Hanh,
Nguyen Ba Tiep, Nguyen Viet Khong, Lai Thi Lan Huong**

SUMMARY

The result of isolation, virulence and antigen determination of *Streptococcus agalactiae* strains caused the disease in Tilapia at Ha Noi, Hai Duong, Quang Ninh, Dong Thap, Tien Giang, Vinh Long, An Giang showed that there were 96% of samples infected with *Streptococcus agalactiae*. The isolated *Streptococcus* strains presenting antigen, belonged to NS5, NS13, LX7, LX8, LX9, LX10, DN8, DN9, DN10, DN12, DN17, O2, TP3, TP4. The virulence of *Streptococcus agalactiae* strains belonging to serotype (TP4, O2, DN12, LX8 and NS5) was very strong.

Keywords: Tilapia, *S. agalactiae*, antigen, virulence.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm vừa qua, ngành thủy sản có tốc độ phát triển nhanh nhất trong các lĩnh vực sản xuất thực phẩm cho con người (Khan et al., 2011). Tại Việt Nam, nuôi trồng thủy sản đã và đang đóng vai trò quan trọng đối với nền kinh tế quốc gia với tổng sản lượng thủy sản đạt 7,28 triệu tấn năm 2017, trong đó khoảng 3,9 triệu tấn là đóng góp từ hoạt động nuôi trồng

thủy sản và thủy sản xuất khẩu, mang lại kim ngạch xuất khẩu đạt hơn 8,3 tỷ USD (VASEP, 2018). Tuy nhiên, việc chuyển đổi cơ cấu nuôi trồng sang nuôi thâm canh đã tạo ra nhiều hệ lụy đến môi trường và đặc biệt là gây ra nhiều loại dịch bệnh nguy hiểm, gây tổn thất kinh tế cho ngành nuôi trồng thủy sản trên toàn thế giới. Hiện nay các khu nuôi thủy hải sản nói chung, vùng nuôi cá rô phi nói riêng, việc sử dụng kháng sinh trong phòng trị bệnh tràn lan, không đúng cách gây ra hiện tượng kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản, dẫn đến hiệu quả điều trị bệnh không có hoặc rất thấp (Sarter et al., 2007). Trong số các vi khuẩn gây

¹ Công ty cổ phần dược và vật tư thú y (Hanvet)

² Viện Thú y

³ Khoa Thú y, Học Viện Nông nghiệp Việt Nam

bệnh trong nuôi trồng thủy sản, *Streptococcus* spp. là tác nhân gây bệnh nguy hiểm vì chúng có phổ ký chủ khá rộng từ cá tầm, cá hồi đến nhóm cá biển và đặc biệt là các loài cá thuộc họ cá rô như cá rô phi (Toranzo và cs, 2005). Vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi có tần suất xuất hiện từ 95-100% ở các tháng có nhiệt độ cao với tỷ lệ gây chết cộng dồn lên đến 42-100% đàn cá nuôi, làm thiệt hại nghiêm trọng cho nghề nuôi cá rô phi thương phẩm tại Việt Nam, do việc dùng kháng sinh không đúng cách, vi khuẩn bị kháng kháng sinh nên điều trị bệnh bằng kháng sinh không hiệu quả (Phạm Hồng Quân et al., 2013).

Để có cơ sở cho việc nghiên cứu và chế tạo vaccin phòng Streptococcosis trên cá rô phi, chúng tôi tiến hành phân lập xác định và kiểm tra độc lực của chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá rô phi.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu bệnh phẩm là gan, thận, lách từ mẫu cá rô phi bị bệnh với các dấu hiệu bệnh lý như bơi lờ đờ mất định hướng, chướng bụng, xuất huyết, lồi mắt, sưng ruột; các cơ quan nội tạng như gan, thận, lách sưng to, xuất huyết, bạc màu.

- Cá rô phi dùng thí nghiệm: Cá rô phi (vằn) giống khỏe mạnh, sạch bệnh, có trọng lượng trung bình 10g/con, cá rô phi (điều hồng) giống khỏe mạnh, sạch bệnh, có trọng lượng trung bình 2,5g/con. Trước khi làm thí nghiệm, cá được nuôi và cho thích nghi với môi trường 3 ngày.

- Các loại môi trường nuôi cấy: BHI broth (Brain heart infusion broth - Merck), BHI agar (Brain heart infusion agar - Merck), BHI có bổ sung 5% máu cừu, nước muối sinh lý 0,85%, kit API20 Strep (BioMerieux, Pháp).

- Thuốc gây mê, bơm tiêm, đĩa lòng nuôi cấy và các trang thiết bị phòng thí nghiệm khác.

2.2. Địa điểm nghiên cứu

- Phòng Thủy sản - Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất sinh phẩm - Công ty cổ phần Dược và Vật tư thú y (Hanvet).

- Trung tâm Thú y vùng 6, và một số phòng thí nghiệm khác.

- Trung tâm giống nông nghiệp Hậu Giang

- Các vùng nuôi cá rô phi tại các tỉnh/thành: Hà Nội, Hải Dương, Quảng Ninh, Đồng Tháp, Tiền Giang, Vĩnh Long, An Giang.

2.3. Nội dung nghiên cứu

- Thu mẫu cá bệnh từ các địa phương và phân lập, định danh vi khuẩn *Streptococcus* spp.

- Lựa chọn chủng vi khuẩn *Streptococcus* spp. có tính kháng nguyên.

- Lựa chọn chủng vi khuẩn *Streptococcus* spp. có độc lực cao.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Thu mẫu, phân lập và định danh vi khuẩn

Thu mẫu cá bệnh

Thu mẫu cá rô phi vằn và rô phi đỏ bị bệnh tại các tỉnh/thành: Hà Nội, Hải Dương, Hải Phòng, Quảng Ninh, Đồng Nai, Tiền Giang, Vĩnh Long, An Giang, Đồng Tháp. Mẫu cá bệnh đang còn sống hoặc mới chết. Cơ quan sử dụng để nuôi cấy phân lập vi khuẩn gồm: Gan, thận, lách, não và mắt vì đây là những cơ quan đích của vi khuẩn *Streptococcus* spp.

Phân lập và định danh vi khuẩn *Streptococcus* spp.

Nuôi cấy và phân lập vi khuẩn *Streptococcus* spp. ở cá rô phi bằng phương pháp nghiên cứu vi khuẩn của Frerich G.N. (1984, 1993). Vi khuẩn được phân lập từ các cơ quan đích trên môi trường BHIA, chuyển về phòng thí nghiệm để phân lập và sàng lọc khuẩn tủa, từ đó chọn ra được các chủng vi khuẩn mang đặc điểm đặc trưng của vi khuẩn *Streptococcus* spp.

Dựa vào hình thái khuẩn lạc có đặc điểm tròn, đường kính nhỏ 1-2mm, hơi lồi và có màu trắng hơi đục. Khuẩn lạc được chọn, tiến hành soi tươi, nhuộm Gram và quan sát trên kính hiển vi ở vật kính 100X, kiểm tra đặc điểm dung huyết trên môi trường thạch máu cừu 5%. Thử các đặc tính sinh hóa bằng kit API20 Strep (BioMerieux, Pháp).

2.4.2. Lựa chọn chủng vi khuẩn *Streptococcus* spp. có tính kháng nguyên

Chế tạo kháng nguyên cho từng chủng vi khuẩn:

Sau 24 giờ vi khuẩn tăng sinh mạnh, sau đó bất hoạt vi khuẩn bằng formalin 38%, sử dụng với tỷ lệ 0,5%.

Bảo quản trong điều kiện 4°C khoảng 24 - 48 giờ. Sau khi bất hoạt bằng formalin, vi khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm môi trường đã nuôi tăng sinh vi khuẩn. Sau đó phần cô đặc nằm dưới đáy ống ly tâm, có màu trắng được thu lại. Thực hiện ly tâm 5000 vòng/phút trong vòng 15 phút. Phần cô đặc được rửa bằng nước muối sinh lý 3 lần. Sau mỗi lần rửa, ly tâm lại để rửa sạch hết formalin. Phần cô đặc nằm dưới ống ly tâm được pha với nước muối sinh lý. Bảo quản ở nhiệt độ 4 - 10°C.

Kháng nguyên của từng chủng vi khuẩn sau khi chế tạo, được tiêm miễn dịch cho cá rô phi với 10^6 - 10^9 CFU/ml /con cá vào xoang bụng, mỗi chủng tiêm cho 10 con cá (lặp lại 3 lần). Sau 21 ngày tiến hành lấy máu và xác định hiệu giá kháng thể của huyết thanh.

Mẫu máu sau khi lấy để ở nhiệt độ phòng 3 giờ rồi ly tâm 2500 vòng/5 phút để thu huyết thanh. Tiến hành phản ứng ngưng kết trên phiến kính. Nếu phản ứng có nhiều ngưng kết màu trắng đục, nhỏ li ti chứng tỏ là có kháng thể kháng vi khuẩn *Streptococcus* spp.

2.4.3. Lựa chọn chủng độc lực

Dùng các chủng có kháng nguyên đã lựa

chọn để gây nhiễm cho cá với LC70 (Lethal Concentration 70). Dựa vào LC70 gây chết cá để đánh giá độc lực của mỗi chủng vi khuẩn.

- Nuôi cấy tăng sinh các dòng vi khuẩn đã lựa chọn trên môi trường BHI ở 30°C trong vòng 18 giờ (Hernandez và cs., 2009).

- Định lượng vi khuẩn bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Gây nhiễm ở các nồng độ vi khuẩn khác nhau, đối chứng bằng nước muối sinh lý. Mỗi nồng độ vi khuẩn được tiêm cho 30 con cá có trọng lượng $20g \pm 5$ với liều 0,2 ml/con cá (thí nghiệm được lặp lại 3 lần).

- Cảm nhiễm bệnh nhân tạo bằng phương pháp tiêm xoang bụng sau khi cá đã được gây mê.

- Theo dõi thí nghiệm, ghi chép số lượng cá chết và kết thúc thí nghiệm sau khi cá ngừng chết 3 ngày liên tục.

- Phân lập vi khuẩn từ mẫu cá bệnh sau khi cảm nhiễm bệnh trên môi trường BHIA, kiểm tra hình thái vi khuẩn, thử phản ứng sinh hóa và kit API20 Strep để khẳng định cá bị bệnh do vi khuẩn cảm nhiễm gây ra.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu mẫu, phân lập và định danh vi khuẩn

3.1.1. Kết quả thu mẫu cá bệnh

Chúng tôi tiến hành phân lập vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* từ 256 mẫu cá bệnh có trọng lượng từ 2g đến 450g tại các tỉnh/thành Hà Nội, Hải Dương, Quảng Ninh, Đồng Tháp, Tiền Giang, Vĩnh Long, An Giang. Hầu hết các mẫu cá bệnh thu được đều có triệu chứng và bệnh tích điển hình: bơi lơ dờ, mất phương hướng; mất lồi và đục; xuất huyết ở nắp mang, thân, gốc vây ngực và vây bụng; mang tái nhạt, bụng trương to, xoang bụng có chứa dịch màu vàng, nội tạng bị xuất huyết, mềm nhũn. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Số mẫu cá bệnh thu được tại các địa phương

STT	Địa điểm	Số hộ thu mẫu	Số lượng cá (con)	Trọng lượng (g)
1	Hà Nội	6	23	15 - 280
2	Hải Dương	7	30	10 - 250
3	Quảng Ninh	6	24	12 - 320
4	Đồng Tháp	16	56	2 - 300
5	Tiền Giang	11	36	5 - 450
6	Vĩnh Long	9	35	5 - 250
7	An Giang	15	52	2 - 430
Tổng cộng		70	256	

3.1.2. Phân lập và định danh vi khuẩn

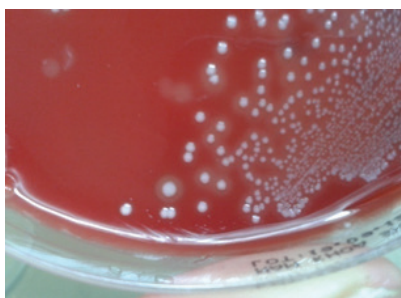
Trước khi tiến hành phân lập, giám định vi

khẩn gây bệnh, những mẫu cá bị bệnh ngoài da do

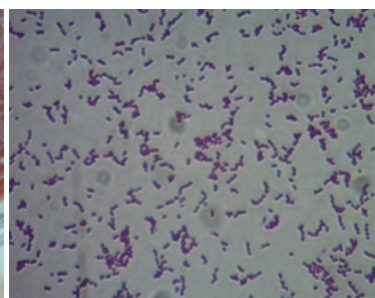
ký sinh trùng hoặc nấm được kiểm tra để loại bỏ.



Hình 1a. Hình thái khuẩn lạc *Streptococcus* spp. trên môi trường BHIA



Hình 1b. Hình thái khuẩn lạc *Streptococcus* spp. trên môi trường thạch máu



Hình 1c. Hình dạng nhuộm Gram của vi khuẩn *Streptococcus* spp.

Bảng 2. Kết quả phân lập vi khuẩn từ mẫu cá bệnh

Tỉnh	Số mẫu	<i>Aeromonas</i> sp.		<i>Flavobacterium</i> sp.		<i>Streptococcus</i> spp.	
		Mẫu (+)	Tỷ lệ (%)	Mẫu (+)	Tỷ lệ (%)	Mẫu (+)	Tỷ lệ (%)
Hà Nội	23	8	34,78	1	4,34	22	95,65
Hải Dương	30	13	43,33	2	6,67	29	96,70
Quảng Ninh	24	5	20,83	1	4,17	23	95,83
Đồng Tháp	56	24	42,85	8	14,28	55	98,21
Tiền Giang	36	14	38,88	4	11,11	35	97,20
Vĩnh Long	35	8	22,85	3	8,57	34	97,14
An Giang	52	14	26,92	6	11,53	51	98,07
Tổng	256	86	33,59	25	9,76	249	97,26

Ghi chú:(+): số mẫu nhiễm

Bảng 2 cho thấy, trên tổng số 256 mẫu cá rô phi bị bệnh, xuất hiện 3 loại vi khuẩn là: *Aeromonas* sp., *Flavobacterium* sp. và *Streptococcus* spp. Trong đó, số mẫu có vi khuẩn *Streptococcus* spp. cao nhất 249/256 mẫu, chiếm tỷ lệ 97,26%; số mẫu có vi khuẩn *Aeromonas* sp. là 86/256, chiếm tỷ lệ 33,59%; số mẫu xuất hiện *Flavobacterium* sp. là 9,76%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với các công bố trước đây của Phạm Hồng Quân và cs, (2013), có 74/86 mẫu dương tính với vi khuẩn *Streptococcus* spp. chiếm tỷ lệ 86,05% (Nguyễn Viết Khuê và cs, 2009); tỷ lệ dương tính với vi khuẩn này là 90% (Liu và cs, 2012).

Sau khi định danh bằng kit API20 Strep, chúng tôi xác định được cả 249 mẫu vi khuẩn *Streptococcus* spp. phân lập được ở trên đều là *S. agalactiae*. Các mẫu vi khuẩn này được giữ trong tủ nhiệt độ -80°C để các đặc tính của vi

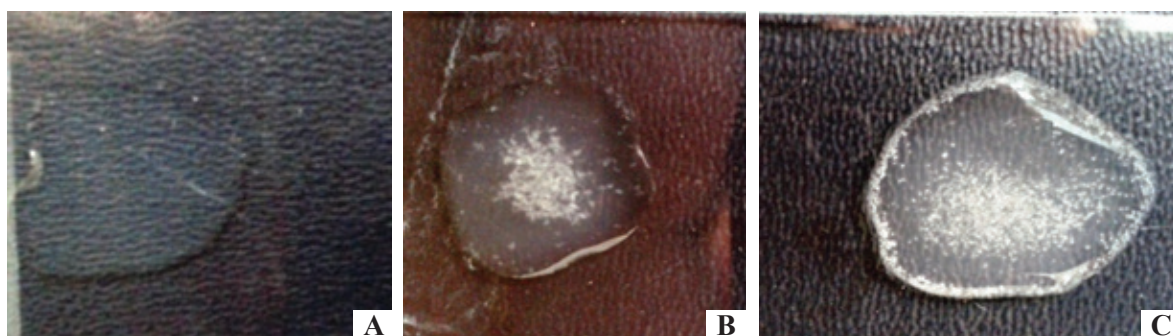
khuẩn ít bị biến đổi.

3.2. Kết quả lựa chọn chủng kháng nguyên

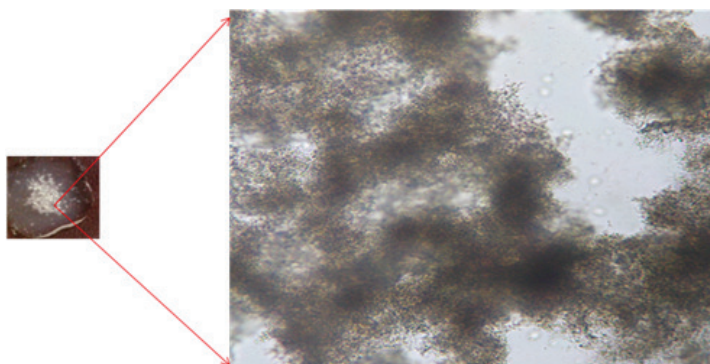
Với mục đích lựa chọn được chủng vi khuẩn đưa vào nghiên cứu sản xuất vacxin ở quy mô công nghiệp, ứng dụng thực tiễn nên cần thiết phải lựa chọn những chủng vi khuẩn có tính kháng nguyên ổn định, có khả năng kích thích cơ thể cá sinh đáp ứng miễn dịch cao, có khả năng bảo hộ rộng.

Đánh giá tính kháng nguyên của các chủng vi khuẩn dựa trên phản ứng ngưng kết với nguyên tắc của sự liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể có thể nhìn thấy được ở dạng kết khối. Kết quả thể hiện ở bảng 2.

+ Các chủng vi khuẩn có phản ứng dương tính: kháng nguyên bị ngưng kết thành từng đám lấm tấm trên phiến kính.



Hình 2. Kết quả phản ứng ngưng kết nhanh trên phiến kính
A: Âm tính; B: Dương tính với vi khuẩn sống; C: Dương tính với vi khuẩn bất hoạt



Hình 3. Cụm ngưng kết quan sát dưới kính hiển vi

+ Các chủng vi khuẩn có phản ứng âm tính: không có hiện tượng ngưng kết thì loại bỏ.

Kết quả kiểm tra phản ứng ngưng kết, chúng tôi thu được 14/246 mẫu vi khuẩn có tính kháng nguyên là các chủng *S. agalactiae* có các ký hiệu NS5, NS13, LX7, LX8, LX9, LX10, ĐN8, ĐN9, ĐN10, ĐN12, ĐN17, O2, TP3, TP4.

3.3. Kết quả lựa chọn chủng độc lực

Từ 14 chủng vi khuẩn có tính kháng

nguyên, chúng tôi tiến hành kiểm tra độc lực trên cá rô phi có trọng lượng $20g \pm 5$ ở nồng độ từ 10^6 đến 10^{10} CFU/ml. Mỗi nồng độ tiêm cho 30 cá với liều 0,2 ml/con (thí nghiệm được lặp lại 3 lần). Sau 24 giờ gây nhiễm, hầu hết các lô cá thử độc lực với liều $0,2 \times 10^8 - 10^{10}$ cfu/ml/con có biểu hiện bệnh với dấu hiệu và bệnh lý điển hình là xuất huyết, lồi mắt, cá chết sau 36 giờ gây nhiễm; riêng chủng O2, cá thử độc lực ở liều 10^6 đã có các biểu hiện trên và chết sau 36 giờ gây nhiễm.



Hình 4. Dấu hiệu bệnh lý của cá sau khi công bằng vi khuẩn *S. agalactiae* độc lực

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, ngoài chủng O2 có cá chết 30% ở nồng độ vi khuẩn 10^6 CFU/ml, còn các chủng khác không có biểu hiện bệnh hoặc chết khi công cường độc ở nồng độ vi khuẩn $10^6 - 10^7$ CFU/ml. Ở nồng độ vi khuẩn 10^8 CFU/ml, có một số vi khuẩn gây chết cá nhưng tỷ lệ không cao. Ở nồng độ vi khuẩn 10^9 CFU/ml, có 5 chủng gây chết với tỷ lệ $>70\%$ cá thí nghiệm là các chủng TP4, O2, ĐN12, LX8 và NS5, các lô đối chứng không có cá chết.

So sánh với báo cáo của Bromage (1999) thì độc lực của các chủng thí nghiệm thấp hơn độc lực của chủng vi khuẩn *S. iniae* phân lập từ cá chêm và cá rô phi đỏ nuôi ở Úc

($LC_{50} = 3,2 \times 10^4$ CFU) (vaccine Adjuvants, 2010) và ở Thái Lan ($LC_{50} = 1,08 \times 10^4$ CFU) (Suanyuk, 2010).

Những cá có dấu hiệu bệnh hoặc chết sau khi cảm nhiễm tại các lô thí nghiệm đều được giải phẫu để kiểm tra, quan sát sự biến đổi bệnh lý của các cơ quan nội tạng. Sau đó tiến hành tái phân lập vi khuẩn từ gan, thận, mắt và não cá trên môi trường BHIA ở nhiệt độ 30°C , trong 24 giờ, thấy khuẩn lạc ở các đĩa môi trường BHIA có màu sắc và hình thái giống với khuẩn lạc của vi khuẩn *Streptococcus* spp. phân lập từ mẫu cá rô phi lúc thu mẫu.

Bảng 3. Kết quả thử độc lực của các chủng vi khuẩn *S.agalactiae*

Số TT	Mã VK	Mật độ VK tiêm (cfu/ml)	Số cá sống/cá tiêm (con)	Tỷ lệ chết (%)
1	NS5	10^{10}	0/30	100,00
		10^9	2/30	93,33
		10^8	28/30	6,67
2	NS13	10^{10}	6/30	80,00
		10^9	9/30	70,00
		10^8	30/30	0,00
3	LX7	10^{10}	9/30	70,00
		10^9	15/30	50,00
		10^8	30/30	0,00
4	LX8	10^{10}	0/30	100,00
		10^9	0/30	100,00
		10^8	21/30	30,00
5	LX9	10^{10}	13/30	56,66
		10^9	9/30	30,00
		10^8	30/30	0,00
6	LX10	10^{10}	15/30	50,00
		10^9	10/30	66,67
		10^8	30/30	0,00
7	ĐN8	10^{10}	0/30	100,00
		10^9	7/30	76,66
		10^8	30/30	0,00
8	ĐN9	10^{10}	6/30	80,00
		10^9	12/30	60,00
		10^8	30/30	0,00
9	ĐN10	10^{10}	9/30	70,00
		10^9	18/30	40,00
		10^8	30/30	0,00
10	ĐN12	10^{10}	0/30	100,00
		10^9	1/30	96,67
		10^8	6/30	80,00
11	ĐN17	10^{10}	6/30	80,00
		10^9	18/30	40,00
		10^8	30/30	0,00
12	O2	10^{10}	0/30	100,00
		10^9	0/30	100,00
		10^8	3/30	90,00
		10^7	7/30	76,67
		10^6	21/30	30,00
13	TP3	10^{10}	21/30	30,00
		10^9	15/30	50,00
		10^8	30/30	0,00
14	TP4	10^{10}	0/30	100,00
		10^9	7/30	76,66
		10^8	30/30	0,00

IV. KẾT LUẬN

- Từ 256 mẫu cá bệnh trên 7 tỉnh/thành Hà Nội, Hải Dương, Quảng Ninh, Đồng Tháp, Tiền Giang, Vĩnh Long, An Giang, đã phân lập được 249 chủng vi khuẩn *S. agalactiae* (chiếm 96 %).

- 14 chủng *S. agalactiae* có tính kháng nguyên là NS5, NS13, LX7, LX8, LX9, LX10, ĐN8, ĐN9, ĐN10, ĐN12, ĐN17, O2, TP3, TP4.

- Từ 14 chủng có tính kháng nguyên, chọn được 5 chủng có độc lực mạnh TP4, O2, ĐN12, LX8 và NS5.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bromage E. S., Thomas A. and Owens L. (1999) Streptococcus iniae, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36: 177-181
2. Frerichs, G.N & Millar (1993). Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens. *Pisces Press*. Stirling, pp. 58
3. Hernandez, E., J. Figueroa and C. Iregui, (2009). Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: A case study. *J. Fish Dis.*, 32: 247-252.
4. Khan, M., Khan, S., Miyan, K. (2011) Aquaculture as a food production system: A review. *Biol Med.* 3, 291-302.
5. Liu Liping, Zhang Zongfeng, Zhang Wembo, Francis Murray, David Little, 2012. Tilapia aquaculture in China: Low market prices, other issues challenge as sector seeks sustainability. *Global Aquaculture Advocate*, Vo 15. Issue 2, March/ April 2012, pp.20-21
6. Nguyễn Việt Khuê, Trương Thị Mỹ Hạnh, Đồng Thanh Hà, Nguyễn Thị Hà, Phạm Thành Đô, Bùi Ngọc Thanh, Nguyễn Thị Nguyên, Nguyễn Hải Xuân, Phạm Thái Giang và Nguyễn Thị Thu Hà (2009). “Xác định nguyên nhân gây chết hàng loạt cá rô phi nuôi thương phẩm tại một số tỉnh miền Bắc”, Báo cáo khoa học Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1.
7. Phạm Hồng Quân, Hồ Thu Thủy, Nguyễn Hữu Vũ, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Lê Văn Khoa, 2013. Một số đặc tính sinh học của vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây bệnh xuất huyết ở cá rô phi nuôi tại một số tỉnh miền Bắc. *Tạp chí khoa học phát triển* tập 11 số 4-2013, trang 506-513.
8. Sarter, S., Kha, N. H. N., Hung, L.T., Jérôme Lazard, J. & Montet, D. 2007 Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control* 18: 1391-1396
9. Toranzo, A.E., Magarin B., Romalde J.L (2005). A review of the main bacterial fish diseases mariculture systems. *Aquaculture* 246: 37-61.
10. Vacxin Adjuvants: Methods and Protocols Edited by Gwyn Davies., 2010. *Humana Press* © Springer Science Business Media, LLC 2010. ISSN 1064-3745. pp 314
11. VASEP (2018). Tổng quan ngành thủy sản Việt Nam. <http://vasep.com.vn/1192/Onecontent/tong-quan-nganh.htm>.

Ngày nhận 13-5-2019

Ngày phản biện 17-7-2019

Ngày đăng 1-9-2019