

# NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VI KHUẨN *AEROMONAS HYDROPHILA* PHÂN LẬP TỪ CÁ RÔ PHI NUÔI TẠI MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC

Nguyễn Thị Bích Thủy<sup>1\*</sup>, Lưu Thị Hải Yến<sup>1</sup>, Nguyễn Xuân Huyền<sup>1</sup>,  
Trần Việt Dũng Kiên<sup>1</sup>, Đặng Phương Anh<sup>1</sup>, Lê Thị Minh Hằng<sup>1</sup>,  
Văn Thị Hương<sup>1</sup>, Đào Thị Toàn<sup>1</sup>, Nguyễn Công Dân<sup>2</sup>, Phùng Quốc Chương<sup>2</sup>  
\*Tác giả liên hệ email: bthuy.nivr@gmail.com

## TÓM TẮT

Kết quả nghiên cứu, phân lập vi khuẩn gây bệnh xuất huyết từ 750 mẫu cá rô phi nghi mắc bệnh tại 5 tỉnh miền Bắc cho thấy tỷ lệ mẫu cá nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh xuất huyết là 19,47% (146/750 mẫu); trong đó tỷ lệ mẫu nhiễm cao nhất là ở số mẫu cá thu thập từ tỉnh Quảng Ninh (21,19%); tiếp đến là ở số mẫu cá thu thập từ tỉnh Hải Dương (20,78%) và thấp nhất là ở số mẫu cá thu thập từ Thành phố Hà Nội (16,11%). Đặc tính sinh hóa đã được xác định ở tất cả (146/146) chủng *A. hydrophila* phân lập được. Kết quả đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được hoàn toàn tương đồng với đặc tính sinh hóa của chủng vi khuẩn *A. hydrophila* tham chiếu - ATCC® 7966. Kết quả kiểm tra 14 gen độc lực trên 50 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được cho thấy có 33/50 (66,0%) chủng mang gen *ahh*; tiếp đến là tỷ lệ chủng mang các gen *ahpB*, *lip*, *aerA* lần lượt là 46%, 42% và 40%; không có chủng nào mang gen *asa1*, *hlyA*. Có 8/10 chủng *A. hydrophila* phân lập được có khả năng gây chết cá thí nghiệm, trong đó chủng AhTN15 gây chết cá với tỷ lệ cao nhất (63,33%) và chủng AhBG32 gây chết cá với tỷ lệ thấp nhất (33,33%).

Từ khóa: Cá rô phi, *Aeromonas hydrophila*, bệnh xuất huyết, vi khuẩn.

## Study on some biological characteristics of *Aeromonas hydrophila* bacteria isolated from tilapia raised in Northern provinces

Nguyen Thi Bích Thuy, Luu Thi Hai Yen, Nguyen Xuan Huyen,  
Tran Viet Dung Kien, Dang Phuong Anh, Le Thi Minh Hang,  
Van Thi Huong, Dao Thi Toan, Nguyen Cong Dan, Phung Quoc Chuong

## SUMMARY

The result of studying and isolating hemorrhagic disease-causing bacteria from 750 tilapia samples suspected of being infected with this disease in 5 Northern provinces showed that the rate of tilapia samples infected with *A. hydrophila* bacteria was 19.47% (146/750 samples). The highest infection rate was in the fish samples collected from Quang Ninh province (21.19%); followed by in the fish samples collected from Hai Duong (20.78%) and the lowest rate was in the fish samples collected from Ha Noi City (16.11%). The biochemical characteristics were determined in all the isolated *A. hydrophila* strains (146/146). As a result, the biochemical characteristics of these isolated *A. hydrophila* strains were fully similar with the biological characteristics of the reference *A. hydrophila* strain - ATCC® 7966. The result of determining 14 virulence genes on 50 isolated *A. hydrophila* strains showed that 33/50 (66.0%) strains carried the *ahh* gene; followed by the the rate of strains carried *ahpB*, *lip*, *aerA* genes with 46%, 42% and 40%, respectively. There was no strain carried the *asa1*, *hlyA* genes. There were 8/10 tested strains capable of causing death in the experimental fish, of which strain AhTN15 caused the highest mortality rate (63.33%) and strain AhBG32 caused the lowest mortality rate (33.33%).

Keywords: Tilapia, *Aeromonas hydrophila*, hemorrhagic disease, bacteria.

<sup>1</sup> Bộ môn Vi trùng, Viện Thú y

<sup>2</sup> Hội Thú y Việt Nam

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá và các động vật thủy sinh khác là nguồn cung cấp protein động vật quan trọng và các chất dinh dưỡng thiết yếu cho con người. Mức tiêu thụ cá thực phẩm đã tăng từ 9 kg/người vào năm 1961 đến 20,5 kg/người vào năm 2017. Trong số đó, cá rô phi (*Oreochromis sp.*) là một trong ba nhóm loài động vật thủy sản được nuôi phổ biến nhất, đáp ứng nhu cầu thức ăn thủy sản và đóng góp cho nền kinh tế của mỗi quốc gia. Tỷ trọng cá rô phi nuôi trong sản lượng thủy sản nuôi trên thế giới đạt 7,34% vào năm 2018; tăng 133% so với năm 1998; ước tính tổng giá trị đạt 11,2 tỷ đô la Mỹ (chiếm 4,5% tổng giá trị các loại thủy sản nuôi).

Theo thống kê của FAO (2018), sản lượng cá rô phi của Việt Nam đạt 260 nghìn tấn, chiếm 4,31% tổng sản lượng cá rô phi toàn cầu, đứng thứ 7 trong số các nước có tổng sản lượng nuôi cá rô phi lớn nhất toàn cầu. Theo báo cáo tổng kết năm 2020 của Tổng cục Thủy sản, tổng diện tích cá nước ngọt của Việt Nam năm 2020 đạt 450,4 nghìn ha; trong đó cá rô phi là 30 nghìn ha.

Tuy nhiên, việc nuôi trồng thủy sản thâm canh đã dẫn đến dịch bệnh, ảnh hưởng đến sản lượng nuôi trồng (Shoemaker *et al.*, 2006). Một trong những căn bệnh gây thiệt hại đáng kể trong nuôi cá là bệnh xuất huyết do *Aeromonas sp.* (chủ yếu là *Aeromonas hydrophila*).

Ngành nuôi trồng thủy sản trên thế giới đã từng bị tổn thất nghiêm trọng vì những đợt dịch bệnh do vi khuẩn *A. hydrophila* độc lực cao (vAh) gây ra (Nielsen *et al.*, 2001; Hemstreet, 2010). Tại Việt Nam, bệnh xuất huyết hay còn gọi là bệnh đốm đỏ, bệnh nhiễm trùng máu do vi khuẩn *A. hydrophila* ở cá được ghi nhận trước năm 1993. Bệnh do *A. hydrophila* ở cá (cá cá tự nhiên và cá nuôi) là nguyên nhân gây ra thiệt hại kinh tế nặng nề do cả tỷ lệ chết cao và giảm sút chất lượng sản phẩm thủy sản (Groff và Lapatra, 2000; Karunasagar *et al.*, 2003). Vì vậy, nghiên cứu phân lập và các đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh hướng tới tạo giống sản xuất vacxin là rất cần thiết.

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

### 2.1. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập vi khuẩn *A. hydrophila* từ cá rô phi tại một số tỉnh phía Bắc

- Nghiên cứu đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được

- Xác định các gen độc lực một số chủng *A. hydrophila* phân lập được

- Kiểm tra khả năng gây bệnh của một số chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được.

### 2.2. Nguyên liệu nghiên cứu

- Cá rô phi có biểu hiện nghi ngờ của bệnh xuất huyết

- Các môi trường, hóa chất dùng trong nuôi cấy, phân lập vi khuẩn *A. hydrophila*: thạch máu (Merck), thạch Rimler Shotts (Merck), Nutrient agar (Merck), kit API20E (BioMérieux), PCR master mix (Thermo), primer định danh vi khuẩn (IDT), primer gen độc lực (IDT),...

- Địa điểm nghiên cứu:

+ Địa điểm thu thập mẫu: các tỉnh Quảng Ninh, Hải Dương, Bắc Giang, Thái Nguyên và Thành phố Hà Nội

+ Địa điểm phân tích mẫu: Phòng thí nghiệm Bộ môn Vi trùng, Viện Thú y

- Thời gian nghiên cứu: Từ năm 2022 đến 2023.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Thu thập mẫu

Thu thập mẫu theo TCVN 8710:21-2019 và TCVN 8710:15-2015. Mẫu cá thu thập là cá nghi mắc bệnh.

#### 2.3.2. Phân lập vi khuẩn *A. hydrophila*

- Theo TCVN 8710-15:2015 - Bệnh nhiễm trùng do *Aeromonas hydrophila* ở cá.

- Mẫu bệnh phẩm gồm lách, thận và não của cá nghi mắc bệnh được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc cho *Aeromonas spp.* Rimler Shotts (R-S), nuôi cấy ở 28°C trong 18-24 giờ. Trên môi trường R-S, vi khuẩn có khuẩn lạc dạng tròn, lồi, nhẵn, màu vàng nhạt. Chọn khuẩn lạc điển hình nuôi cấy trên môi trường Nutrient agar (NA), thạch máu (BA) để kiểm tra hình thái và đặc tính sinh hóa.

#### 2.3.3. Giám định các đặc tính sinh hóa

- Kiểm tra các đặc tính sinh hóa của vi khuẩn nghi ngờ bằng bộ kit API20E, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Giám định vi khuẩn bằng phương pháp PCR:  
 + Chiết tách DNA: bằng phương pháp sốc nhiệt. Lấy 1 vòng que cấy khuẩn lạc của chủng vi khuẩn cần kiểm tra trên thạch máu, hòa vào 100µl nước free DNA-RNA; đặt trong heating block ở 100°C trong 10 phút. Sau đó, đưa huyền dịch vào -20°C trong 5 phút. Cuối cùng, ly tâm huyền dịch ở 12.000rpm/4 phút, thu hoạch phần nước trong để thực hiện phản ứng PCR.

+ Trình tự nucleotide cặp mỗi định danh vi khuẩn *A. hydrophila*: sử dụng cặp mỗi AeroFd/ AeroRs:

AeroFd:5'-CCAAGGGGTCTGTGGCGACA-3'

AeroRs:5'-TTTCACCGGTAACAGGATTG-3'

+ Thành phần phản ứng PCR: 25µl master mix, 2µl mỗi AeroFd (20 µM), 2µl mỗi AeroRs (20 µM), 2 µl DNA, 21 µl nước free DNA.

+ Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 95°C/4 phút; 30 chu kỳ gồm: 95°C/30 giây, 54°C/45 giây, 72°C/30 giây; 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR (khoảng 209bp) được kiểm tra thông qua điện di với 1,5% (v/v) agarose gel trong dung dịch đệm 0,5x TBE, bổ sung Gel red (10µl/100ml), đọc dưới tia UV.

**Bảng 1. Trình tự nucleotide và chu trình nhiệt xác định gen độc lực của các chủng *A. hydrophila***

Gen	Tên mỗi	Trình tự DNA (5'-3')	Kích thước sản phẩm (bp)	Chu trình nhiệt
<i>ahh1</i>	AHH1-F	GCCGAGCGCCCAGAAGGTGAGTT	130	- 95°C/5 phút - 50 chu kỳ (95°C/30 giây, 59°C/30 giây, 72°C/30 giây) - 72°C/7 phút
	AHH1-R	GAGCGGCTGGATGCGGTTGT		
<i>Asa1</i>	ASA1-F	TAAAGGGAATAATGACGGCG	249	- 72°C/7 phút
	ASA1-R	GGCTGTAGGTATCGGTTTTCG		
<i>AerA</i>	aerA-F	CAAGAACAAGTTCAAGTGGCCA	309	- 95°C/10 phút - 25 chu kỳ (95°C/15 giây, 66°C/30 giây, 72°C/30 giây) - 72°C/10 phút
	aerA-R	ACGAAGGTGTGGTTCCAGT		
<i>Act</i>	ACT-F	AGAAGGTGACCACCAAGAACA	232	- 95°C/5 phút - 25 chu kỳ (95°C/25 giây, 55°C/30 giây, 72°C/1 phút) - 72°C/5 phút
	ACT-R	AACTGACATCGGCCTTGAACTC		
<i>Ast</i>	AST-F	TCTCCATGCTTCCCTTCCACT	331	- 95°C/3 phút - 35 chu kỳ (94°C/1 phút, 60°C/1 phút, 72°C/1 phút) - 72°C/5 phút
	AST-R	GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG		
<i>Alt</i>	ALT-F	TGACCCAGTCCTGGCACGGC	442	- 95°C/3 phút - 35 chu kỳ (94°C/1 phút, 54°C/1 phút, 72°C/1 phút) - 72°C/5 phút
	ALT-R	GGTGATCGATCACCACCAGC		
<i>ahpB</i>	ahpB-F	ACACGGTCAAGGAGATCAAC	513	- 95°C/3 phút - 35 chu kỳ (94°C/1 phút, 60°C/1 phút, 72°C/1 phút) - 72°C/5 phút
	ahpB-R	CGCTGGTGTGGCCAGCAGG		
<i>Lip</i>	Lip-F	ATCTTCTCCGACTGGTTCGG	382	- 95°C/3 phút - 35 chu kỳ (94°C/1 phút, 54°C/1 phút, 72°C/1 phút) - 72°C/5 phút
	Lip-R	CCGTGCCAGGACTGGTCTT		
<i>hlyA</i>	hlyA-F	TTCGTGCCAAACCTGGATGT	592	- 95°C/3 phút - 35 chu kỳ (94°C/1 phút, 54°C/1 phút, 72°C/1 phút) - 72°C/5 phút
	hlyA-R	TCAGGGTCCGTAGGCTCACA		
<i>β-hly</i>	βhly-F	TTGTGAGGGTTATCGTTGTGG	587	- 95°C/3 phút - 35 chu kỳ (94°C/1 phút, 54°C/1 phút, 72°C/1 phút) - 72°C/5 phút
	βhly-R	TGCTCGCCTGTCTTGTAC		
<i>aha</i>	Aha-F	GGCTATTGCTATCCCGGCTCTGTT	1082	- 95°C/3 phút - 35 chu kỳ (94°C/1 phút, 54°C/1 phút, 72°C/1 phút) - 72°C/5 phút
	Aha-R	CGGTCCACTCGTCGTCCATCTTG		
<i>omp</i>	Omp-F	GGAATTCACAATACCGCCGACTCTAC	756	- 95°C/3 phút - 35 chu kỳ (94°C/1 phút, 54°C/1 phút, 72°C/1 phút) - 72°C/5 phút
	Omp-R	CGGTCCGACCAGGAAAGTCCAGGCATC		
<i>apoB</i>	apoB-F	CGATAAGCAGTGAACGCCCTCT	308	- 95°C/3 phút - 35 chu kỳ (94°C/1 phút, 54°C/1 phút, 72°C/1 phút) - 72°C/5 phút
	apoB-R	CTCGAACACTTCCGGGAGACG		
<i>vasH</i>	vasH-F	TTTTCCACCCTCTTGCTATG	509	- 95°C/3 phút - 35 chu kỳ (94°C/1 phút, 54°C/1 phút, 72°C/1 phút) - 72°C/5 phút
	vasH-R	AGCCGTGCCACCGCCTCCTT		

### 2.3.4. Xác định gen độc lực

Xác định gen độc lực của *A. hydrophila* bằng PCR tham khảo của Wang G (2003), Kingombe CI (1999), Sen K (2004) và Soler L (2002)

Trình tự các cặp mồi và điều kiện phản ứng được trình bày ở bảng 1.

### 2.3.5. Đánh giá khả năng gây bệnh trên cá

- Cá thí nghiệm: cá rô phi giống có chiều dài cơ thể từ 25mm, khối lượng >10g (QCVN 02-33-1: 2020/BNNPTNT); chưa từng nhiễm *A. hydrophila*, khỏe mạnh. Cá được nuôi giữ trong bể nhựa có sục khí, nuôi 5-7 ngày trước khi tiến hành các thí nghiệm để làm quen với môi trường thí nghiệm.

- Chuẩn bị vi khuẩn thí nghiệm: khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn phân lập được trên môi trường TSA; xác định mật độ vi khuẩn theo phương pháp đếm khuẩn lạc của A. A. Miles (1938).

- Xác định độc lực vi khuẩn theo phương pháp của Trương Thị Hoa và cs. (2018)

Thí nghiệm được bố trí trong hệ thống bể nhựa 100L-150L, có sục khí. Bố trí 1 nghiệm thức/chủng vi khuẩn. Tiêm 0,1 mL dịch huyền phù mỗi chủng vi khuẩn với liều tiêm  $10^8$  CFU/0,1mL vào xoang bụng của cá (30 cá/chủng vi khuẩn). Nghiệm thức đối chứng tiêm 0,1 mL nước muối sinh lý (20 cá/lô đối chứng). Kiểm tra cá hàng ngày để theo dõi số cá chết và xác định những chủng vi khuẩn gây chết cá trong 3 ngày. Tiến hành phân lập lại vi khuẩn từ não và gan cá. Giám định một số đặc tính sinh hóa và thực hiện phản ứng PCR định danh để khẳng định chủng vi khuẩn gây chết cá là chủng vi khuẩn sử dụng trong thí nghiệm xác định độc lực. Những chủng vi khuẩn gây chết cá trong 3 ngày thí nghiệm được xem là những chủng có độc lực và có khả năng gây bệnh trên cá.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *A. hydrophila* từ các mẫu cá thu thập

Chúng tôi đã tiến hành thu thập các mẫu cá có biểu hiện xuất huyết, hoạt động kém ở một số cơ sở nuôi cá tại 5 tỉnh phía Bắc bao gồm Bắc Giang, Hà Nội, Hải Dương, Quảng Ninh và Thái Nguyên. Lách, thận và não của cá nghi mắc bệnh được nuôi cấy phân lập vi khuẩn trên môi trường thạch Rimler Shotts (R-S), nuôi cấy ở 28°C trong 18-24 giờ. Kết

quả được trình bày ở bảng 1. Kết quả từ bảng 1 cho thấy tỷ lệ vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh xuất huyết ở cá rô phi tại một số tỉnh phía Bắc là 19,47%; cao nhất là mẫu thu thập từ tỉnh Quảng Ninh, có 32 mẫu dương tính trên tổng số 151 mẫu phân lập (chiếm 21,19%); tiếp đến là các mẫu thu thập ở Hải Dương có tỷ lệ nhiễm là 20,78% và thấp nhất là mẫu cá thu thập từ Hà Nội (16,11%).

**Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn *A. hydrophila* từ các mẫu cá thu thập**

Tỉnh	Số mẫu thu thập	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Bắc Giang	151	29	19,21
Hà Nội	149	24	16,11
Hải Dương	154	32	20,78
Quảng Ninh	151	32	21,19
Thái Nguyên	145	29	20,00
<b>Tổng</b>	<b>750</b>	<b>146</b>	<b>19,47</b>

Ở Việt Nam, các loài cá nuôi lồng, bè và nuôi ao nước ngọt thường gặp bệnh đốm đỏ như: rô phi, trắm cỏ, cá trôi, cá chép, cá mè, cá ba sa, cá bống tượng, các hệ nuôi bè, cá tai tượng, cá trê, cá nheo... Vi khuẩn có thể gây bệnh ở ba ba, cá sấu, bệnh đốm chân ở ếch, đốm nâu ở tôm càng xanh. Tỷ lệ tử vong ở động vật thủy sản thường từ 30-70%, riêng ở cá giống (ba ba, trê) có thể chết 100%. Bệnh lây lan nhanh, tỷ lệ chết cao (có thể đến 90%, ở giai đoạn cá giống tỷ lệ chết có thể lên tới 100%). Bệnh xuất huyết do *A. hydrophila* xảy ra quanh năm, tập trung vào mùa xuân và mùa thu ở miền Bắc, mùa mưa ở miền Nam, đặc biệt là khi cá bị stress như sau khi trời mưa (Bùi Quang Tề, 2006; Đinh Văn Huân, 2016).

Phạm Hồng Quân và cs. (2013) khi nghiên cứu về bệnh xuất huyết trên cá rô phi nuôi tại 4 tỉnh (Hà Nội, Hải Phòng, Hải Dương và Quảng Ninh) đã phân lập được 16/60 chủng *Aeromonas* spp. từ các mẫu cá rô phi bị bệnh. Tỷ lệ phân lập ở các tỉnh nghiên cứu từ 13,33-53,33%.

Nguyễn Hữu Vũ và cs. (2013) nuôi cấy các mẫu bệnh phẩm từ cá rô phi có dấu hiệu của bệnh xuất huyết, cũng phân lập được *Aeromonas* spp. với tỷ lệ 32,85% (323/983 mẫu). Nhóm tác giả đã thu thập mẫu cá rô phi ở 10 tỉnh/thành trên cả nước; tỷ lệ phân lập được *Aeromonas* spp ở các tỉnh từ 20,0-45,38%.

Gần đây, Ninh và cs. (2021) đã tiến hành nghiên cứu tỷ lệ nhiễm *A. hydrophila* trên 3 loài cá nước ngọt được nuôi phổ biến nhất ở miền Bắc nước ta là cá rô phi, cá chép và cá trắm cỏ, cá nheo. Kết quả nghiên cứu trên 506 mẫu cá bị bệnh xuất huyết (gồm 198 mẫu cá rô phi, 187 mẫu cá chép và cá trắm cỏ, 121 mẫu cá nheo) được thu thập từ 54 trại nuôi cá thuộc 16 tỉnh ở khu vực miền Bắc nước ta đã xác định được tỷ lệ nhiễm *A. hydrophila* khá cao, với 46,4% mẫu cá bệnh nhiễm vi khuẩn này. Trong đó, tỷ lệ nhiễm *A. hydrophila* ở 3 loài cá là khá tương đồng, với tỷ lệ nhiễm ở cá rô phi là 47,0%, cá chép và cá trắm cỏ là 47,6%, và cá nheo là 44,6%. Có thể nói đây là công bố đầu tiên khá chi tiết về tỷ lệ nhiễm *A. hydrophila* trên các loài cá nước ngọt được nuôi phổ biến nhất ở khu vực miền Bắc.

Việc phân lập được *Aeromonas* sp. từ các mẫu bệnh phẩm nghiên cứu với 1 tỷ lệ tương đối cao cho thấy vi khuẩn *Aeromonas* sp. đóng vai trò nhất định gây bệnh xuất huyết trong đàn cá rô phi nuôi nói riêng và cá nước ngọt nói chung. Thực trạng này cho thấy nhu cầu cần thiết của 1 biện pháp hữu hiệu trong phòng bệnh do *Aeromonas* sp. trên cá nước ngọt.

Các nghiên cứu nêu trên là cơ sở khoa học thực

tế để khẳng định về sự lưu hành phổ biến và vai trò gây bệnh xuất huyết của vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá nước ngọt, đặc biệt là cá rô phi, cá chép và cá trắm cỏ được nuôi ở miền Bắc nước ta hiện nay.

### 3.2. Kết quả kiểm tra đặc tính sinh hóa của các chủng *A. hydrophila* bằng kit API20E

Kiểm tra một số đặc tính sinh hóa của 146 chủng *A. hydrophila* phân lập được đều cho thấy: tất cả các chủng đều là vi khuẩn gram âm, hình que ngắn, oxidase và catalase dương tính.



**Hình 1. Hình ảnh khuẩn lạc nghi ngờ *A. hydrophila* trên môi trường R-S agar**

**Bảng 2. Kết quả kiểm tra đặc tính sinh hóa của các chủng *A. hydrophila* phân lập bằng kit API20E**

STT	Chỉ tiêu	Số chủng kiểm tra	Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)
1	ONPG	146	146	100,0
2	ADH	146	146	100,0
3	LDC	146	146	100,0
4	ODC	146	0	0
5	CIT	146	146	100,0
6	H <sub>2</sub> S	146	0	0
7	URE	146	0	0
8	TDA	146	0	0
9	IND	146	146	100,0
10	VP	146	0	0
11	GEL	146	146	100,0
12	GLU	146	146	100,0
13	MAN	146	146	100,0
14	INO	146	0	0
15	SOR	146	0	0
16	RHA	146	0	0
17	SAC	146	146	100,0
18	MEL	146	0	0
19	AMY	146	146	100,0

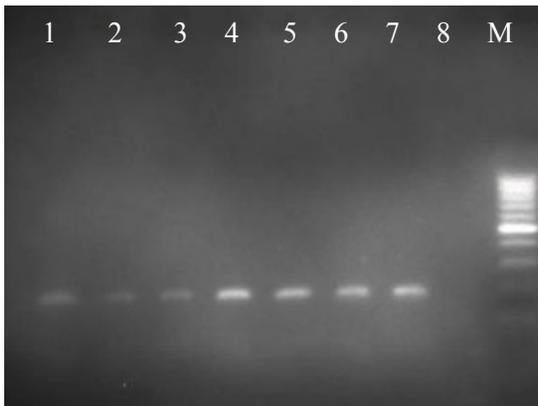
Kiểm tra tất cả các chủng này bằng bộ kit API20E cho kết quả thể hiện ở bảng 2.

Kết quả trên cho thấy: toàn bộ 146 chủng kiểm tra đều có đặc tính sinh học của *A. hydrophila* và tương đồng với chủng tham chiếu *A. hydrophila* ATCC® 7966.

**Bảng 3. Kết quả giám định vi khuẩn *A. hydrophila* bằng phương pháp PCR**

Vi khuẩn	Số chủng kiểm tra	Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)
<i>A. hydrophila</i>	146	146	100

Khi kiểm tra bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu AeroFd/AeroRs, tất cả 100% (146/146) chủng kiểm tra đều cho sản phẩm PCR là 1 băng duy nhất có kích thước tương đương 209bp. Như vậy, kết quả thu được hoàn toàn tương đồng với các đặc tính của chủng vi khuẩn tham chiếu *A. hydrophila* ATCC® 7966.



**Hình 2. Phản ứng PCR giám định vi khuẩn *A. hydrophila***

Ghi chú: Giếng 1-6: mẫu kiểm tra, giếng 7: đối chứng dương (chủng *A. hydrophila* ATCC® 7966), giếng 8: đối chứng âm (nước free DNA/RNA), giếng M: marker 100bp.

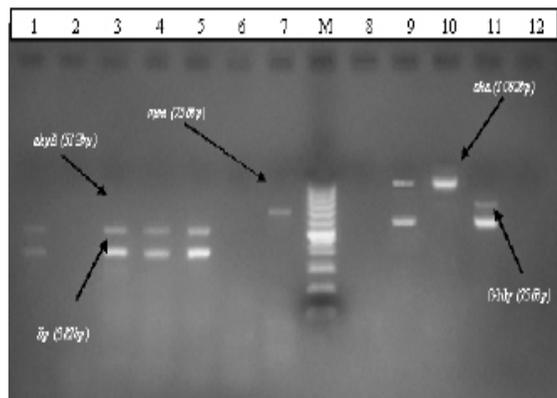
**3.3. Xác định gen độc lực của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được**

Chúng tôi đã lựa chọn 50 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* ổn định về hình thái và đặc tính nuôi cấy, sử dụng phản ứng PCR để kiểm tra 14 gen độc lực gồm *ahh1*, *asa1*, *aerA*, *act*, *ast*, *alt*, *ahpB*, *lip*, *β-hly*, *aha*, *omp*, *hlyA*, *apoB*, *vasH*. Kết quả được thể hiện ở bảng 4 và hình 3.

**Bảng 4. Kết quả kiểm tra các gen độc lực ở 50 chủng *A. hydrophila* phân lập được**

STT	Tên gen	Số chủng dương tính/ số chủng kiểm tra	Tỷ lệ (%)
1	<i>ahh1</i>	33/50	66,0
2	<i>asa1</i>	0/50	0
3	<i>aerA</i>	20/50	40,0
4	<i>act</i>	19/50	38,0
5	<i>ast</i>	12/50	24,0
6	<i>alt</i>	8/50	16,0
7	<i>ahpB</i>	23/50	46,0
8	<i>lip</i>	21/50	42,0
9	<i>β-hly</i>	9/50	18,0
10	<i>aha</i>	5/50	10,0
11	<i>omp</i>	6/50	12,0
12	<i>hlyA</i>	0/50	0
13	<i>apoB</i>	4/50	8,0
14	<i>vasH</i>	11/50	22,0

Kiểm tra 14 gen độc lực trên 50 chủng vi khuẩn *A. hydrophila*, 38/50 chủng có mang ít nhất 1 gen độc lực, nhiều nhất là 6 gen độc lực. Tỷ lệ các chủng mang 1, 2, 3, 4, 5 và 6 gen độc lực lần lượt là 4%, 6%, 4%, 16%, 30% và 16%. Trong đó 33/50 (66,0%) chủng mang gen *ahh1*, chiếm tỷ lệ cao nhất. Tiếp đến là các gen *ahpB*, *lip*, *aerA* với tỷ lệ lần lượt là 46%, 42% và 40%; không có chủng nào mang gen *asa1*, *hlyA*.



**Hình 3. Ảnh PCR xác định gen độc lực của các chủng *A. hydrophila***

Ghi chú: giếng 1, 7: *A. hydrophila* ATCC gen *ahpB* + *lip* + *omp*; giếng 2, 8: đối chứng âm, giếng 3, 4, 5, 9, 10, 11: chủng dương tính với các gen kiểm tra; giếng 6, 12: chủng âm tính với các gen kiểm tra.

### 3.4. Kết quả kiểm tra độc lực của các chủng *A. hydrophila*

Từ kết quả xác định gen độc lực ở trên chúng tôi lựa chọn 10 chủng vi khuẩn đại diện mang các gen độc lực để tiếp tục kiểm tra xác định khả năng gây bệnh trên cá bằng phương pháp gây bệnh thực nghiệm.

Chúng tôi thực hiện kiểm tra độc lực của 10 chủng *A. hydrophila* bằng cách tiêm 0,1ml canh trùng vi khuẩn vào xoang bụng cá; số lượng vi khuẩn trung bình trong 1 liều tiêm là  $1,07 \times 10^8$  CFU/liều tiêm (từ  $0,98 - 1,2 \times 10^8$  CFU/0,1ml). Kết quả được thể hiện ở bảng 5.

**Bảng 5. Kết quả kiểm tra độc lực của các chủng *A. hydrophila* bằng phương pháp gây bệnh thực nghiệm trên cá**

TT	Ký hiệu chủng	Số lượng vi khuẩn (CFU/ml)	Số cá chết/ số tiêm	Tỷ lệ chết (%)	Thời gian gây chết cá (giờ)
1	AhHN33	$1,2 \times 10^9$	0/30	0	-
2	AhTN15	$1,0 \times 10^9$	19/30	63,33	24
3	AhQN4	$1,15 \times 10^9$	16/30	53,33	18-24
4	AhQN19	$1,04 \times 10^9$	0/30	0	-
5	AhBG32	$1,12 \times 10^9$	10/30	33,33	36-48
6	AhBG45	$1,06 \times 10^9$	15/30	50,00	24-36
7	AhHN34	$1,02 \times 10^9$	12/30	40,00	36-48
8	AhHD32	$1,1 \times 10^9$	14/30	46,67	24-36
9	AhHD51	$0,98 \times 10^9$	12/30	40,00	36
10	AhHD144	$1,02 \times 10^9$	13/30	43,33	30-48
11	Đối chứng	Nước sinh lý	0/20	0	-

Sau 3 ngày theo dõi, kết quả ghi nhận có 8/10 chủng có khả năng gây chết cá thí nghiệm, 2 chủng AhQN19 và AhHN33 không gây chết cá thí nghiệm. Trong các chủng gây chết cá thí nghiệm, chủng AhTN15 gây chết cá với tỷ lệ cao nhất (63,33%), tiếp đến là chủng AhQN14 (53,33%), AhBG45 (50%). Chúng tôi cũng đều phân lập lại được vi khuẩn từ các cá chết ở các lô thí nghiệm.

Quan sát ghi nhận: Ở giai đoạn đầu sau khi nhiễm bệnh, cá kém ăn hoặc bỏ ăn, nổi lờ đờ trên tầng mặt. Da cá thường đổi màu tối không có ánh bạc, mắt nhợt. Ở giai đoạn tiếp theo, xuất hiện các đốm xuất huyết trên thân, các gốc vây, quanh miệng, mắt và hậu môn; xuất hiện các vết loét ăn sâu vào cơ; mắt lồi đục, quanh hốc mắt bị sưng tấy, mắt nhợt; hậu môn viêm xuất huyết; bụng chướng to, các vây xơ rách. Cá chết nhiều trong thời gian ngắn. Mô khám cá có thể thấy nhiều dịch đỏ lẫn máu ở xoang bụng, ruột chứa đầy hơi, gan thận hoại tử, xoang bụng xuất huyết, mật sưng to, thận xuất huyết.

Đặng Thụy Mai Thy và cs. (2012) khi gây bệnh thực nghiệm trên cá rô đồng cho biết khi tiêm kết hợp 2 loài vi khuẩn *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. trên cá rô đồng thì tỷ lệ chết của cá sẽ tăng lên đáng kể (90%) so với tiêm riêng từng chủng vi khuẩn (tỷ lệ chết lần lượt là 25% và 45%). Ngoài ra, qua kết quả nghiên cứu cũng cho thấy thời gian cá chết ở nghiệm thức tiêm kép xuất hiện sớm hơn so với tiêm đơn. Kết quả này cho thấy mức độ nghiêm trọng khi cá nhiễm cả 2 loài vi khuẩn này, dẫn tới tổn thất nặng nề cho người nuôi.

## IV. KẾT LUẬN

- Tỷ lệ phân lập vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh xuất huyết ở cá rô phi trung bình tại 5 tỉnh phía Bắc là 19,47%; cao nhất là ở tỉnh Quảng Ninh (21,19%); tiếp đến là các mẫu thu thập ở Hải Dương có tỷ lệ nhiễm là 20,78% và thấp nhất là mẫu cá thu thập từ Hà Nội (16,11%).

- Tất cả (146/146) chủng kiểm tra hoàn toàn tương đồng với các đặc tính của chủng vi khuẩn tham chiếu *A. hydrophila* ATCC® 7966. Khi giám định bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu AeroFd/AeroRs, 100% các chủng phân lập đều cho sản phẩm PCR là 1 băng duy nhất có kích thước tương đương 209bp.

- Kiểm tra 14 gen độc lực trên 50 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* cho thấy 33/50 (66,0%) chủng mang gen *ahhI*. Tiếp đến là các gen *ahpB*, *lip*, *aerA* với tỷ lệ lần lượt là 46%, 42% và 40%; không có chủng nào mang gen *asaI*, *hlyA*.

- Có 8/10 chủng kiểm tra có khả năng gây chết cá thí nghiệm; trong đó chủng AhTN15 gây chết cá với tỷ lệ cao nhất (63,33%) và thấp nhất là chủng AhBG32 (33,33%).

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí đề tài “Nghiên cứu chế tạo vaccin nhĩ giá vô hoạt phòng bệnh xuất huyết cho cá rô phi do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* và *Aeromonas hydrophila* gây ra” do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn cấp.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Thị Hiền và cs., 2015. *Nghiên cứu di truyền học các chủng Aeromonas hydrophila gây bệnh trên cá tra*. Đề tài KHCN trọng điểm cấp Nhà nước.
- Đình Văn Huấn, 2016. *Phòng và điều trị một số bệnh thường gặp ở cá nuôi*. <http://snn.phutho.gov.vn/Chuyen-muc-tin/Chi-tiet-tin/t/phong-va-dieu-tri-mot-so-benh-thuong-gap-o-ca-nuoi/title/5462/ctitle/33?AspxAutoDetectCookieSupport=1>.
- 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 I.
- TCVN 8710-15: 2015 - Bệnh thủy sản - Qui trình chẩn đoán - Phần 15: *Bệnh nhiễm trùng do Aeromonas hydrophila ở cá*.
- Bùi Quang Tề, 2006. *Bệnh học thủy sản*. Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản I.
- 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, trường Đại học Cần Thơ.
- Đặng Thụy Mai Thy, Trần Thị Thùy Cúc, Nguyễn Châu Phương Lam, Nguyễn Đức Hiền và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2012. *Đặc điểm mô bệnh học cá rô (Anabas testudineus) nhiễm vi khuẩn Aeromonas hydrophila và Streptococcus sp. trong điều kiện thực nghiệm*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, số 22c: 183-193.
- Azad, I.S., K.V. Rajendran, J.J.S. Rajan, K.K. Vijayan and T.C. Santiago, 2001. *Virulence and histopathology of Aeromonas hydrophila (Sah 93) in experimentally infected tilapia, Oreochromis mossambicus (L.)*. Journal of Aquaculture in the Tropics, 16: 265-275.
- Figueiredo, J. and J.A. Plumb, 1977. *Virulence of different isolates of Aeromonas hydrophila in channel catfish*. Aquaculture, 349-354.
- Nhinh, D.T., Le, D.V., Van, K.V., Huong Giang, N.T., Dang, L.T., 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, 532. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050532>.
- Pang, M., Jiang, J., Xie, X., Wu, Y., Dong, Y., Kwok, A.H.Y., et al., 2015. *Novel insights into the pathogenicity of epidemic Aeromonas hydrophila ST251 clones from comparative genomics*. *Sci. Rep.* 5:9833.

Ngày nhận: 12-9-2024

Ngày phản biện: 15-9-2024

Ngày đăng: 1-11-2024