

XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN GÂY BỆNH XUẤT HUYẾT TRÊN CÁ BỔNG KÈO (*Pseudapocryptes elongatus*) NUÔI Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Nguyễn Thu Dung¹, Đặng Thị Hoàng Oanh²

TÓM TẮT

Xuất huyết là bệnh gây nhiều thiệt hại cho nghề nuôi cá bống kèo (*Pseudapocryptes elongatus*) ở đồng bằng sông Cửu Long. Các dấu hiệu bệnh lý thông thường của bệnh là xuất huyết ở da, vây và hậu môn. Cá bệnh có tỷ lệ chết cao và lây bệnh nhanh. Những dấu hiệu bệnh lý bên ngoài của bệnh này rất dễ phát hiện. Tuy nhiên, quan sát các dấu hiệu bệnh lý từ bên ngoài không đủ để xác định loài vi khuẩn gây bệnh để làm cơ sở cho việc phòng và điều trị bệnh. Vì vậy, mẫu cá bống kèo bị bệnh xuất huyết được thu từ các vùng có nhiều hộ nuôi cá bống kèo thâm canh. Quan sát bằng kính hiển vi tiêu bản nhuộm Gram mẫu thận phết kính của cá bệnh cho thấy có vi khuẩn hình cầu, Gram dương. Vi khuẩn được phân lập từ thận trước, gan và tụy tạng của cá bị bệnh xuất huyết mọc trên môi trường brain heart agar (bổ sung 1,5% NaCl) là vi khuẩn Gram dương, không di động, oxidaza và catalaza âm tính. Vi khuẩn được định danh là *Streptococcus disgalactiae* bằng phương pháp sinh hóa, kit API 20 strep, PCR và giải trình tự gen 16S rARN. Thí nghiệm cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm cho thấy *S. disgalactiae* có khả năng gây bệnh trên cá bống kèo với dấu hiệu bệnh lý giống như cá bệnh trong ao thu mẫu với giá trị LD₅₀ khoảng 4,25 x 10⁴ CFU/ml. Kết quả phân tích mô bệnh học các mẫu cá bệnh cho thấy các hiện tượng hoại tử đặc trưng do nhiễm khuẩn ở gan và thận tụy tạng. Đây là báo cáo đầu tiên về bệnh xuất huyết do *S. disgalactiae* gây ra trên cá bống kèo nuôi ở Việt Nam.

Từ khóa: Cá bống kèo, *Streptococcus disgalactiae*, bệnh xuất huyết, độc lực.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá bống kèo (*Pseudapocryptes lanceolatus*) là đối tượng thủy sản đang được nuôi phổ biến ở các tỉnh ven biển như Sóc Trăng, Bạc Liêu và Cà Mau. Cá bống kèo được nuôi rộng rãi dưới nhiều hình thức như: (i) nuôi ghép với tôm trong ruộng lúa hay trong ruộng muối, (ii) nuôi trong vuông nuôi chuyên tôm và (iii) nuôi thâm canh trong ao. Tuy nhiên việc mở rộng diện tích và sự thâm canh hóa nghề nuôi cá bống kèo không thể tránh khỏi tình trạng dịch bệnh xảy ra ngày càng nhiều và gây thiệt hại ngày càng lớn. Bệnh phổ biến và gây thiệt hại nghiêm trọng trong các mô hình nuôi cá bống kèo là bệnh xuất huyết (Nguyễn Thu Dung và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2013). Hiện tại, hầu như chưa có công trình nghiên cứu nào về bệnh, nhất là bệnh xuất huyết ở cá kèo được công bố. Tuy nhiên, đã có nhiều công trình nghiên cứu về bệnh xuất huyết trên các đối tượng nuôi thủy sản nước ngọt (như cá chép, cá nheo Mỹ, cá tra, cá rô phi, cá điêu hồng hay lươn đồng) và nước lợ mặn (như cá rô phi, cá chêm, cá chình, cá

hôi). Tác nhân gây bệnh chủ yếu gây bệnh xuất huyết ở động vật thủy sản được công bố nhiều nhất là vi khuẩn thuộc các giống *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas* và *Streptococcus*.

Việc xác định tác nhân gây bệnh xuất huyết ở cá không thể chỉ dựa vào dấu hiệu bệnh lý bên ngoài mà phải kết hợp với những xét nghiệm đặc hiệu thì mới có cơ sở để xác định chính xác về tác nhân gây bệnh và biện pháp phòng trị. Nhằm cung cấp thông tin cho việc phòng trị hiệu quả bệnh xuất huyết trên cá bống kèo, đã tiến hành thực hiện đề tài: "Xác định tác nhân gây bệnh xuất huyết trên cá bống kèo nuôi ở đồng bằng sông Cửu Long". Nội dung của đề tài là: nghiên cứu đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và khả năng gây bệnh xuất huyết của vi khuẩn *Streptococcus disgalactiae* đối với cá bống kèo.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp thu và phân lập vi khuẩn từ mẫu bệnh phẩm

Năm mươi bốn mẫu cá bống kèo được thu từ 6 ao nuôi thương phẩm (cá đã được nuôi khoảng 2-4 tháng) ở tỉnh Bạc Liêu, trong đó 3 ao có dấu hiệu xuất huyết (24 mẫu) và 3 ao không có biểu hiện bệnh

¹ Nghiên cứu sinh khóa 2011, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

(30 mẫu). Mẫu được thu là những con cá có biểu hiện lơ đờ, bơi lội mất phương hướng. Mẫu cá sau khi được vớt khỏi mặt nước được tiến hành phân tích ngay và chỉ những mẫu bệnh phẩm còn sống mới được sử dụng để phân lập vi khuẩn. Trước khi phân lập vi khuẩn, mặt ngoài cơ thể cá được khử trùng bằng cồn 70° và lau sạch. Sau đó, tiến hành mổ cá bằng dao mổ, kéo tiết trùng. Dấu hiệu bệnh lý bên trong cơ thể cá được ghi nhận. Kế đến, dùng dao mổ tiết trùng rạch một đường trên thận, gan và tụy tạng. Đặt que cấy vào nơi vừa rạch, xoay nhẹ để lấy mẫu

bệnh phẩm và cấy trên đĩa môi trường Brain heart infusion agar có bổ sung 1,5% NaCl (BHIA⁺, Merck). Đĩa cấy được ủ ở 30°C trong 24-48 giờ. Các khuẩn lạc phát triển trên môi trường BHIA⁺ được chọn để xác định các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá, thực hiện phản ứng PCR và giải trình tự gen 16S rARN. Các chủng vi khuẩn phân lập được trữ ở -80°C trong môi trường Brain heart infusion broth có bổ sung 1,5% NaCl (BHIB⁺, Merck) và 25% glycerin. Các chủng vi khuẩn nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Các chủng vi khuẩn phân lập từ cá bống kèo bệnh xuất huyết chọn nghiên cứu

STT	Mã PTN	Nơi thu mẫu	Cơ quan phân lập	Năm thu mẫu
1	B 1-6T	Thành phố Bạc Liêu	Thận	2014
2	B 1-6TT	Thành phố Bạc Liêu	Tụy tạng	2014
3	B 2-3T	Huyện Hòa Bình, Bạc Liêu	Thận	2014
4	B 2-3TT	Huyện Hòa Bình, Bạc Liêu	Tụy tạng	2014
5	B 2-5G	Huyện Hòa Bình, Bạc Liêu	Gan	2014
6	B 2-6G	Huyện Hòa Bình, Bạc Liêu	Gan	2014
7	B 2-7TT	Huyện Hòa Bình, Bạc Liêu	Tụy tạng	2014
8	B 3-2G	Huyện Đông Hải, Bạc Liêu	Gan	2014
9	B 4-6T	Huyện Đông Hải, Bạc Liêu	Thận	2014
10	B 6-9TT	Huyện Đông Hải, Bạc Liêu	Tụy tạng	2014

Ghi chú: (T) Thận; (G) Gan; (TT) Tụy tạng.

2.2. Phương pháp định danh vi khuẩn

2.2.1 Phương pháp xác định các chỉ tiêu về hình thái, sinh lý và sinh hóa

Các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa được chọn để định danh vi khuẩn được trình bày ở bảng 2. Hình dạng, kích thước và tính rờn của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram. Tính di động của vi khuẩn được quan sát bằng cách nhỏ một giọt nước cất lên lam, trải đều lên lam một ít vi khuẩn, đập bằng lamén và quan sát bằng kính hiển vi ở vật kính 40X. Các đặc điểm sinh lý và sinh hóa được xác định dựa theo cẩm nang của Cowan và Steels (Barrow và Feltham, 1993) và sử dụng kit API 20 Strep (BioMerieux, Pháp).

2.2.2 Phương pháp PCR

Chiết tách ADN: ADN từ vi khuẩn được chiết tách theo phương pháp của Bartie và đồng tác giả (2006). Vi khuẩn được nuôi tăng sinh 16-18 giờ trong 5 ml môi trường nutrient broth (có bổ sung 1,5% NaCl) ở nhiệt độ 28°C, sau đó được sử dụng để ly trích ADN bằng cách cho cho 1,5 ml dung dịch vi khuẩn vào ống ly tâm cùng với 100 µl 10 mM Tris-

HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 (TE). Hỗn hợp được đun nóng ở 95°C trong 15 phút, rồi được làm lạnh trong nước đá và ly tâm 2 phút ở vận tốc 14.000 vòng/phút để tách dung dịch ADN và trữ ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Khuếch đại ADN:

Thành phần hóa chất phản ứng PCR khuếch đại gen 16S rARN: được thực hiện dựa theo qui trình của Nunan *et al.* (2003). Tổng thể tích phản ứng 50 µl gồm 1X dung dịch đệm, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 2,5 UI Taq ADN polymerase, 0,22 µM mỗi xuôi (7611F), 0,22 µM mỗi ngược (7611R) và 20 ng mẫu ADN. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 2 phút, sau đó 95°C trong 3⁰ giây, 45°C trong 30 giây, 72°C trong 2 phút; lặp lại chu kì trên 30 lần; 45°C trong 1 phút; 72°C trong 2 phút. Trọng lượng phân tử đoạn ADN của *S. disgalactiae* cần phát hiện là 1500 bp.

Thành phần hóa chất phản ứng PCR phát hiện *S. disgalactiae*: được thực hiện dựa theo qui trình của Hassan *et al.* (2003) có điều chỉnh (Lê Thanh Cần, 2015). Tổng thể tích phản ứng 30 µl, gồm: 1X dung dịch đệm, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs,

1,25 UI Taq ADN polymeraza, 0,4 μ M mỗi xuôi (STRD-DyI), 0,4 μ M mỗi ngược (dys-16S-23S-2) và 50 ng mẫu ADN vi khuẩn. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 94°C trong 4 phút, sau đó 94°C trong 30 giây, 50°C trong 60 giây, 72°C trong 30 giây, lặp lại chu kỳ trên 30 lần, 72°C trong 5 phút, giữ ở 20°C. Trọng lượng phân tử đoạn ADN của *S. disgalactiae* cần phát hiện là 259 bp.

Điện di. 10 μ l sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel 1,5% agarosa (ABgene, UK) trong dung dịch đệm $\times 1$ TAE (10 mM Tris, 5 mM axetat, 0,1 mM EDTA). Kết quả điện di được ghi nhận bằng máy đọc gel Vilber Lourmat (Pháp). Thang ADN 1 kb plus (Invitrogen) được chạy chung với mẫu để xác định kích thước của các vạch ADN.

2.2.3 Giải trình tự

Sản phẩm PCR gen 16S rARN được gửi đến Công ty Nam Khoa giải trình tự. Kết quả giải trình tự được so sánh bằng chương trình Blast search trên ngân hàng gen (GenBank) của NCBI để định danh loài vi khuẩn.

2.3. Phương pháp gây cảm nhiễm

Thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm úớt Khoa Thủy sản, trường Đại học Cần Thơ trên hệ thống bể nhựa (500 L và 60 L). Bể nhựa 500 lít được vệ sinh kỹ bằng xà phòng và clo 200 ppm, phơi khô. Sau đó cấp nước vào khoảng 2/3 bể, có sục khí. Xô nhựa 60 lít cấp nước khoảng 1/3 bể được đặt trong phòng. Nguồn nước sử dụng là nước máy có độ mặn 10‰.

Cá bống kèo có khối lượng khoảng 15 - 20 g/con. Cá trong đối đồng cỡ, khỏe mạnh, linh hoạt, da sáng bóng. Cá sau khi mua về được dưỡng trong bể nhựa 500 lít, có sục khí khoảng 1 tuần. Trước khi tiến hành bố trí thí nghiệm, chọn ngẫu nhiên 5 con cá để kiểm tra ký sinh trùng và vi sinh. Cá được bố trí ngẫu nhiên 20 con/bể và để vài ngày cho cá quen với môi trường trong bể.

Chủng vi khuẩn B1-6T được chọn để gây cảm nhiễm. Vi khuẩn được phục hồi trên môi trường tryptic soy agar có bổ sung 1,5% NaCl (TSA⁺, Merck) và giữ trong tủ ấm 48 giờ ở 28°C, sau đó chọn hai khuẩn lạc thuần nuôi tăng sinh trong môi trường tryptic soy broth có bổ sung 1,5% NaCl (TSB⁺, Merck) 24-48 giờ, ly tâm 5000 vòng/phút trong 3 phút ở 4°C, rửa 2 lần bằng dung dịch 0,85% NaCl và xác định mật độ vi khuẩn bằng máy so màu quang

phổ ở bước sóng 610 nm kết hợp với phương pháp đếm số khuẩn lạc phát triển trên môi trường TSA⁺. Cá được gây cảm nhiễm bằng cách tiêm 0,1 ml dung dịch vi khuẩn ở gốc vi ngực.

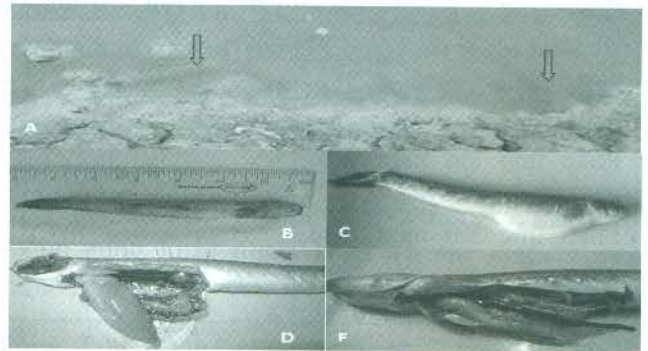
Thí nghiệm xác định mật độ vi khuẩn gây chết 50% cá thí nghiệm (LD₅₀) được bố trí gồm 8 nghiệm thức, lặp lại ba lần: (1) đối chứng tiêm nước muối sinh lý (0,85% NaCl) (0,1 ml/cá); (2-7) tiêm vi khuẩn lần lượt với mật độ 10²-10⁸ CFU/ml. Cá được theo dõi các biểu hiện liên tục trong 14 ngày sau cảm nhiễm. Những con cá lờ đờ được thu để quan sát dấu hiệu bệnh lý, làm tiêu bản kính phết thận, tái phân lập và tái định danh vi khuẩn từ thận bằng phương pháp PCR. Mẫu mô gan và thận của cá bệnh ở các nghiệm thức gây cảm nhiễm và cá khoẻ (đối chứng) được lấy để xác định đặc điểm mô bệnh học theo phương pháp của Coolidge và Howard (1979). Nồng độ vi khuẩn gây chết 50% cá thí nghiệm (LD₅₀) được xác định theo công thức của Reed và Muench (1938):

$$LD_{50} = 10^{a-p.d.}$$

Trong đó: p.d = (L%-50/L%-H%); a: số lữ thừa mà tại đó vi khuẩn gây chết cá thấp nhất nhưng trên 50%; H%: tỷ lệ cá chết cao nhất nhưng dưới 50%; L%: tỷ lệ cá chết thấp nhất nhưng trên 50%.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Dấu hiệu bệnh lý

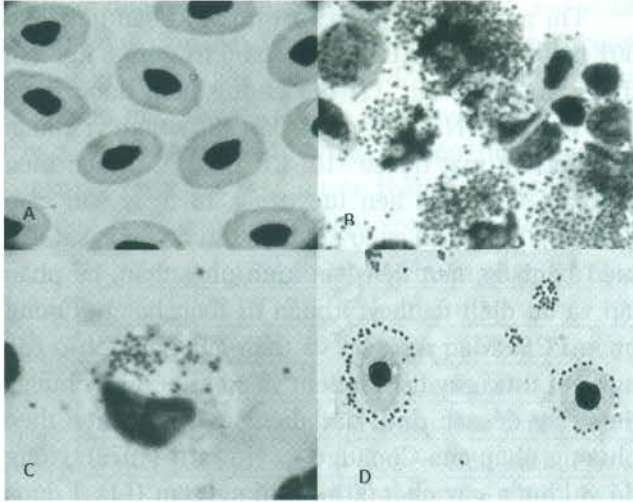


Hình 1. Dấu hiệu bệnh lý của cá bống kèo thu từ ao nuôi.

A: Cá tấp mé (mũi tên). B: Cá bị xuất huyết trên các vây và toàn thân. C: Cá bị chướng bụng. D: Gan cá bị xuất huyết và thận bị nhũn. E: Gan cá bị nhầy, thận sưng to và xuất huyết

Cá bệnh bơi lờ đờ, tấp mé, bỏ ăn, không phản ứng hoặc phản ứng rất chậm với tiếng động. Nhìn bên ngoài cá có màu sắc nhợt nhạt, xuất huyết nhiều ở vùng trên thân (như ở bụng, nắp mang, vi ngực, vi bụng, vi lưng, vi hậu môn). Dấu hiệu bệnh lý bên

trong được ghi nhận là xoang bụng chứa đầy dịch nhờn, gan xuất huyết hoặc tái nhạt, tụy tạng sưng to hoặc teo nhỏ và xuất huyết, thận xuất huyết và nhũn, mật sưng to (Hình 1).



Hình 2. Vi khuẩn trong thận của cá bống kèo bệnh thu từ ao nuôi. A: Mẫu thận cá khỏe. B: Vi khuẩn phá vỡ tế bào C: Đại thực bào. D: Tế bào hồng cầu cá kèo bị vi khuẩn bao quanh và phá vỡ màng tế bào

Quan sát dưới kính hiển vi tiêu bản kính phết mẫu thận nhuộm Gram của cá bệnh thấy rất nhiều cụm vi khuẩn hình cầu nằm rải rác trên vùng mô phết kính hoặc tập trung thành từng cụm. Ở một số mẫu thận cá bệnh, vi khuẩn xâm nhập, phá hủy tế bào làm tế bào bị vỡ. Các mẫu ở thận cũng cho thấy đại thực bào chứa vi khuẩn bên trong (Hình 2A, 2 B và 2C).

3.2. Phân lập và định danh vi khuẩn

Kết quả phân lập được 37 chủng vi khuẩn từ gan, thận và tụy tạng cá bệnh. Chọn ra 10 chủng vi khuẩn (3 chủng phân lập từ thận; 3 chủng phân lập từ gan và 4 chủng phân lập từ tụy tạng) để định danh bằng các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và kit API 20 Strep, (Bảng 1). Trên môi trường BHIA⁺ sau 48 giờ ở 30°C vi khuẩn phát triển chậm thành các khuẩn lạc có hình tròn, lồi, màu trắng đục, kích thước khoảng 0,7-1 mm (Hình 3). Vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường có chứa 5% máu cừu nhưng không có khả năng gây tan huyết. Tất cả các chủng vi khuẩn đều không phát triển trong môi trường TSB có bổ sung 6,5% NaCl.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá của vi khuẩn phân lập từ cá bống kèo bệnh xuất huyết

Chỉ tiêu	Chủng vi khuẩn										Buller (2004)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Nhuộm Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Hình dạng	cầu	cầu	cầu	cầu	cầu	cầu	cầu	cầu	cầu	cầu	
Di động	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sinh catalaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sinh oxidaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Phản ứng lên men yếm khí	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Phản ứng lên men hiếu khí	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mọc trên môi trường máu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gây tan huyết	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thủy phân axit hipuric niệu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bile-esculin tolerance	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pyrrolidonyl arylamidaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sinh α-galactosidaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sinh β-glucuronidaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sinh β-galactosidaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kiểm photphataza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leuxin aminopeptidaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Acgimin dihydrolaza	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+

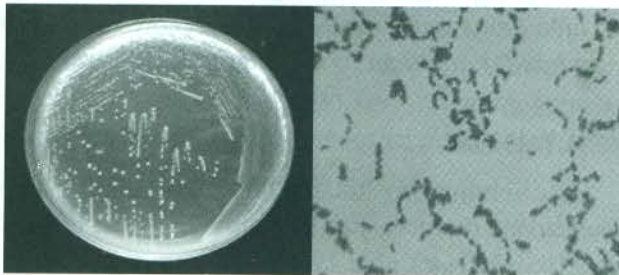
Sử dụng đường												
Riboza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Trehaloza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Glucogen	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Ghi chú: (1) B1-6T, (2) B1-6TT, (3) B2-3T, (4) B2-3TT, (5) B2-5G, (6) B2-6G, (7) B2-7TT, (8) B3-2G, (9) B4-6T, (10) B6-9TT, (+) dương tính, (-) âm tính.

Kết quả quan sát và phân tích các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập từ cá bống kèo bệnh xuất huyết được trình bày ở bảng 2. Dựa trên các chỉ tiêu sinh hóa và căn cứ vào mã số định danh của kit API 20 Strep, tất cả 10 chủng vi khuẩn được định danh là *Streptococcus dysgalactiae*. Kết quả này tương tự như kết quả của Buller (2004) khi định danh vi khuẩn *S. dysgalactiae* dựa trên các phản ứng sinh hóa bằng kit API 20 Strep, ngoại trừ chỉ tiêu glucogen và lactoza là âm tính, so với kết quả của Buller (2004) là dương tính.

Bốn chủng vi khuẩn (B1-6T, B2-3TT, B2-5G và B6-9TT) được chọn để khuếch đại gen 16S rARN và giải trình tự. Kết quả so sánh trình tự nucleotit đoạn gen 16S rARN trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gen (GenBank) bằng chương trình trực tuyến BLASTn, các chủng B1-6T (tương đồng 99%), B2-3TT (tương đồng 99%), B2-5G (tương đồng 100%) và B6-9TT (tương đồng 99%) với đoạn 16S rARN của chủng vi khuẩn *Streptococcus dysgalactiae subsp* được phân lập từ cá nục bệnh (số hiệu Genbank là KM077497.1).

Kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi STRD-DyI/dys-16S-23S-2 đặc hiệu cho vi khuẩn *S. dysgalactiae* ở hình 4 cho thấy tất cả các chủng đều dương tính với sản phẩm PCR có kích thước là 259 bp.



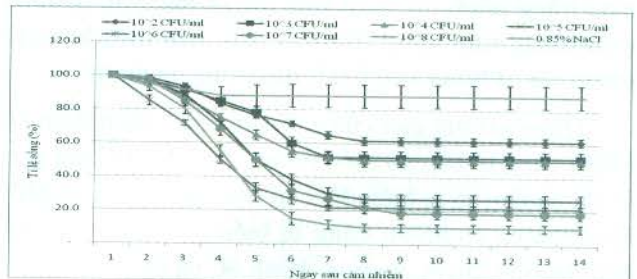
Hình 3. (trái) Khuẩn lạc trên môi trường BHIA bổ sung 1,5% NaCl. (phải) Vi khuẩn hình liên cầu, Gram dương (100X)



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *Streptococcus dysgalactiae*. Giếng M: thang ADN 1 kb plus, giếng (+): đối chứng dương, giếng 1-10: 10 chủng vi khuẩn phân lập từ cá bống kèo bệnh xuất huyết, giếng (11): đối chứng âm (nước)

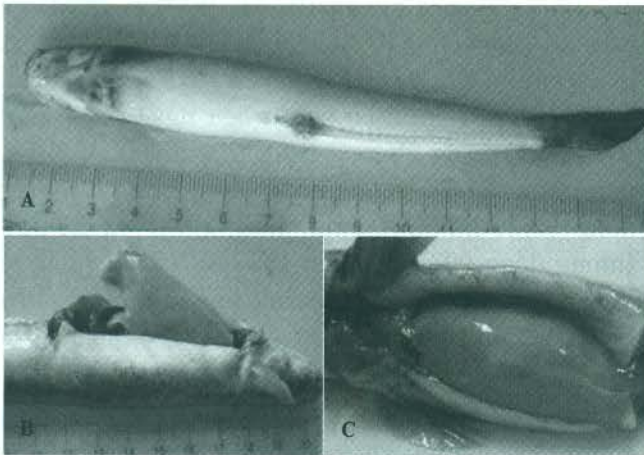
3.3. Khả năng gây bệnh xuất huyết ở cá bống kèo của vi khuẩn phân lập

Kết quả gây cảm nhiễm chủng B1-6T ở những mật độ khác nhau thì tỉ lệ chết và thời gian xuất hiện bệnh cũng khác nhau. Ở tất cả các mật độ cảm nhiễm vi khuẩn đều có cá chết (Hình 5). Cá thí nghiệm bắt đầu chết vào ngày thứ hai sau cảm nhiễm, kéo dài đến ngày thứ 8 và sau đó không có cá chết đến khi kết thúc thí nghiệm.



Hình 5. Biểu đồ tỉ lệ cá chết (%) theo ngày cảm nhiễm

Sau 14 ngày theo dõi thí nghiệm, cá chết 90% ở mật độ tiêm vi khuẩn 10^8 CFU/ml, tỉ lệ chết thấp nhất (38,33%) ở mật độ tiêm vi khuẩn 10^2 CFU/ml. Ở các mật độ còn lại 10^3 đến 10^7 CFU/ml cá chết với tỉ lệ lần lượt là 48,33%, 50%, 73,33%, 78,33% và 81,67%. Cá ở nghiệm thức tiêm nước muối sinh lý cũng bị chết trong vòng 2-4 ngày sau khi tiêm nhưng sau đó không có cá chết, tỉ lệ chết thấp (11,67%), phân lập không có vi khuẩn. Như vậy, cá chết ở nghiệm thức này có thể do bị sốc vì thao tác tiêm nước muối sinh lý và tỉ lệ chết này là không đáng kể so với các nghiệm thức còn lại. Từ kết quả thí nghiệm gây cảm nhiễm xác định được giá trị LD_{50} của chủng vi khuẩn B1-6T là $4,25 \times 10^4$ CFU/ml.



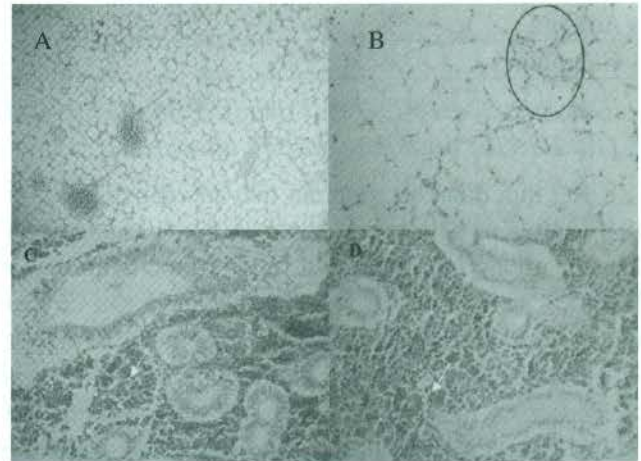
Hình 6. Dấu hiệu bệnh lý của cá thí nghiệm cảm nhiễm. (A) Cá bị huyết hậu môn, cơ thể xuất hiện cơ bị hoại tử; (B) Tỳ tạng sưng to; (C) Gan bị xuất huyết

Cá chết ở thí nghiệm cảm nhiễm có dấu hiệu bệnh lý giống nhau là tách đàn, bỏ ăn và bơi lơ đờ trên mặt nước. Cơ thể có màu sắc nhợt nhạt, mắt nhợt, bụng trương to, thân cong, xuất hiện các khối u màu đỏ trên bề mặt cơ thể hoặc ổ chứa dịch dưới da. Xuất huyết trên bề mặt cơ thể, nắp mang, các vi, hậu môn và cuống đuôi. Xoang nội quan chứa dịch có mùi hôi, gan sưng to, xuất huyết hoặc teo nhỏ có màu trắng nhợt, tụy tạng xuất huyết, sưng to, thận có màu trắng, ruột sưng (Hình 6). Các dấu hiệu bệnh lý giống với cá bống kèo bệnh thu trong ao nuôi.

Quan sát mô gan của cá bống kèo cảm nhiễm có nhiều vùng tế bào có hiện tượng xung huyết, mô gan có dịch viêm và bị biến đổi cấu trúc (Hình 6A và 6B). Mô thận cá có nhiều vùng bị biến đổi cấu trúc, ống thận bị xuất huyết, xơ hóa (Hình 6C và 6D).

Những con cá lơ đờ sau khi gây cảm nhiễm với vi khuẩn *S. dysgalactiae* được giải phẫu để tải phân

lập vi khuẩn ở thận. Kết quả phân lập được vi khuẩn từ thận trên môi trường BHIA⁺ sau 48 giờ ở 30°C. Khuẩn lạc ở các đĩa có màu sắc và hình dạng tương tự nhau là khuẩn lạc có hình tròn, lồi, màu kem, kích thước khoảng 1 mm, giống với khuẩn lạc của vi khuẩn phân lập từ cá kèo bệnh xuất huyết lúc thu mẫu. Vi khuẩn tái phân lập được từ những cá bệnh trong khoảng 24 -48 giờ sau khi cảm nhiễm được xác định là *S. dysgalactiae* bằng phương pháp PCR.



Hình 6. A. Tĩnh mạch gan bị xung huyết (1) (10X); (D) Vùng mô gan có dịch viêm và biến đổi cấu trúc (40X). C. (C) Ống thận bị biến đổi cấu trúc (1), thận có hiện tượng xuất huyết (1) (40X); (D) Ống thận bị xơ hóa (1), mô thận có hiện tượng xuất huyết (1) (40X)

4. THẢO LUẬN

Các chủng vi khuẩn được xác định là *S. dysgalactiae* dựa trên các đặc tính sinh hóa, trình tự genien 16S rARN và nhất là cho phản ứng dương tính với cặp mồi đặc hiệu của *S. dysgalactiae* giúp phân biệt chúng với các nhóm cầu khuẩn khác và trong nhóm *Streptococcus* (Hassan *et al.*, 2003; Buller, 2004; Nomoto *et al.*, 2004; Netto *et al.*, 2011).

Sự hiện diện cầu khuẩn Gram dương nằm rải rác hoặc tập trung thành từng đám trên vũng mô kính phết thận khi nhuộm Gram cũng được mô tả ở cá chim bạc *Pampus argenteus*, cá điêu hồng (*Oreochromis sp*) và cá rô đồng (*Anabas testudineus*) nhiễm *S. agalactiae* (Duremdez *et al.*, 2004; Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012; Đặng Thị Hoàng Oanh và đồng tác giả, 2012). Hiện tượng xuất huyết, bị biến đổi cấu trúc, hoại tử và xuất hiện dịch viêm ở gan, thận và tụy tạng cho thấy khả năng gây bệnh ở mức tế bào của vi khuẩn *S. dysgalactiae* (Robert, 1989).

Giá trị LD₅₀ của chủng *S. dysgalactiae* B1-6T mà chúng tôi xác định được là 4,25x10⁴ CFU/mL phù hợp với nghiên cứu của Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương (2012) xác định giá trị LD₅₀ của vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá điều hồng là 4,89x10⁴ CFU/ml. Vi khuẩn *S. iniae* được phân lập từ cá chêm nuôi tại Úc được xác định giá trị LD₅₀ là 3,2x10⁴ CFU/cá (Bromage *et al.*, 1999). Chủng *S. dysgalactiae* B1-6T trong nghiên cứu của chúng tôi gây chết cá thí nghiệm sau 48 giờ tiêm phù hợp với thí nghiệm trước đây của Bromage *et al.* (1999) gây chết cá chêm (*Lates calcarifer*) sau 18-24 giờ cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae*.

5. KẾT LUẬN

Vi khuẩn *S. dysgalactiae* là tác nhân gây bệnh xuất huyết trên cá bống kèo. Dấu hiệu bệnh lý bên ngoài là xuất huyết trên bề mặt cơ thể, nắp mang, các vi, hậu môn và cuống đuôi. Dấu hiệu bệnh lý bên trong là xuất huyết ở gan, thận và tụy tạng.

Cá kèo bệnh xuất huyết do vi khuẩn *S. dysgalactiae* gây ra có gan và thận xung huyết hoặc xuất huyết, biến đổi cấu trúc, hoại tử và có dịch viêm.

LỜI CẢM ƠN

Các nội dung trong báo cáo này được thực hiện từ nguồn kinh phí nghiên cứu do Bộ Giáo dục và Đào tạo cấp để thực hiện đề tài: Nghiên cứu bệnh xuất huyết trên cá Bống kèo (*Pseudapocryptes lanceolatus*) nuôi thương phẩm và đề xuất giải pháp phòng, trị (Mã số: B2013- 16-29).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agnew, W. and A. C. Barnes, 2007. *Streptococcus iniae*. An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*, 122: 1-15.

2. Barrow, G. I. and R. K. A. Feltham, 1993. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge. 262.

3. Bartie, K., D. T. H. Oanh, G. Huys, C. Dickson, M. Cnockaert, J. Swings, N. T. Phương và A. Teale, 2006. Ứng dụng REP-PCR và PFGE để định tuýp vi khuẩn kháng cloramphenicol phân lập tại các trại nuôi thủy sản ở đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Công nghệ sinh học*. 4 (1): 31-40.

4. Buller, N. B., 2004. *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practice identification manual*. 361 pp.

5. Bromage, E. S., Thomas, A., Owens, L. (1999). *Streptococcus iniae* a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Dis. Aquat. Org.* 36, 177- 181.

6. Coolidge, R. M. Howard, 1979. *Animal Histology Procedures* (2nd edn. ed.). National Institutes of Health, Bethesda.

7. Duremdez, R., Al-Marzouk, A., Qasem, J. A., Al-Harbi, A. and H. Gharabally, 2004. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen) in Kuwait. *Journal of Fish Diseases* 27, 307-310.

8. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012. Phân lập và xác định đặc điểm của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* từ cá điều hồng (*Oreochromis* sp.) bệnh phù mắt và xuất huyết. *Tạp chí Khoa học. Đại học Cần Thơ*. 22c: 203-212.

9. Đặng Thị Hoàng Oanh, Trương Quỳnh Như và Nguyễn Đức Hiền, 2012. Phân lập và xác định khả năng gây bệnh xuất huyết trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*) của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*. *Tạp chí Khoa học. Đại học Cần Thơ*. 22c: 194-202.

10. Hassan A. A., Khan I. U. and C. Lämmler, 2003. Identification of *Streptococcus dysgalactiae* Strains of Lancefield's group C, G and L by Polymerase Chain Reaction. *J. Vet. Med. B* 50, 161-165.

11. Lê Thanh Cần, 2015. Phát triển qui trình PCR chẩn đoán bệnh xuất huyết ở cá bống kèo (*Pseudapocryptes elongatus*). Luận văn cao học. Khoa Thủy sản. Đại học Cần Thơ.

12. Netto L. N., C. A. G. Leal and H. C. P. Figueiredo, 2011. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Fish Disease*. 34: 251-254.

13. Nguyễn Thu Dung và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2013. Hiện trạng về quản lý dịch bệnh trong nuôi cá bống kèo (*Pseudapocryptes lanceolatus*) ở tỉnh Bạc Liêu. *Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học*, số 27: 169-177.

14. Nomoto R., L. Munasinghe, D. Jin, Y. Shimahara, H. Yasuda, A. Nakamura, 2004. Lancefield group C. *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. *Journal of Fish Disease*. 27: 679-686.
15. Reed, L. J. and H. Muench, 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* 27, 493-497.
16. Robert, R. J., 1989. *Fish pathology*. Institute of Aquaculture, University of Strirling, Bailliere Tindall, London. 2nd edition.

DETERMINATION OF CAUSATIVE AGENT OF HEMORRHAGIC DISEASE IN MUDSKIPPER (*Pseudapocryptes elongatus*) CULTURED IN THE MEKONG DELTA

Nguyen Thu Dung, Dang Thi Hoang Oanh

Summary

Hemorrhagic disease has been one of significant problem in cultured mudskipper (*Pseudapocryptes elongatus*) in the Mekong delta, Vietnam. Usual clinical signs of disease include haemorrhage in skin, fin and anal with high mortality and widespread. These clinical signs are easy to spot for the layman. However, the observation of the clinical signs from a macroscopic perspective is insufficient to determine the species of bacteria responsible for the disease. These pieces of information are crucial to be collected in order to anticipate the utilization of prevention and treatment. Therefore, diseased specimens were collected at farms, where intensive culture of mudskipper are commonly practiced. Microscopic observation of fresh smear of kidney from diseased specimens revealed small cocci, Gram positive bacterial cells. Bacteria isolates from head kidney, liver and spleen were recovered on brain heart agar (supplemented with 1.5% NaCl) were recorded as Gram positive, cocci, non-motile, oxidase and catalase negative. They were identified as *Streptococcus dysgalactiae* using a combination of conventional biochemical test, API 20 strep system, PCR and 16S rRNA gene sequencing. Histopathological examination of diseased specimens showed a typical sign of bacterial necrosis in kidney and liver. Challenge experiments using injection method showed that they can cause the observed disease signs with the LD₅₀ value about 4.25 x 10⁴ CFU/m. This is the first report on *Streptococcus dysgalactiae* outbreak in mudskipper in Vietnam.

Keywords: Hemorrhagic disease, *Pseudapocryptes elongatus*, pathogenicity, *Streptococcus dysgalactiae*.

Người phản biện: TS. Hà Kỳ

Ngày nhận bài: 10/6/2015

Ngày thông qua phản biện: 10/7/2015

Ngày duyệt đăng: 17/7/2015