Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ
Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học
ISSN 1859-2333 | e-ISSN 2815-5599

DOI:10.22144/ctujos.2024.428

KHẢO SÁT MẦM BỆNH VI KHUẨN GÂY BỆNH XUẤT HUYẾT ĐƯỜNG RUỘT TRÊN CÁ LÓC (*Channa striata*) NUÔI THƯƠNG PHẨM Ở ĐỒNG THÁP

Nguyễn Thị Thu Hằng[1*], Trương Quỳnh Như[2] và Trần Thị Tuyết Hoa[1]
[1]*Khoa Bệnh học thủy sản, Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam*
[2]*Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam*
**Tác giả liên hệ (Corresponding author): ntthang@ctu.edu.vn*

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 19/03/2024
Sửa bài (Revised): 18/04/2024
Duyệt đăng (Accepted): 21/06/2024

Title: *The survey of bacterial pathogens on hemorrhagic intestinal diseased snakehead fish (Channa striata) raised commercially in Dong Thap*

Author(s): *Nguyen Thi Thu Hang[1*], Truong Quynh Nhu[2] and Tran Thi Tuyet Hoa[1]*

Affiliation(s): *[1]Faculty of Aquatic Pathology, College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University, Viet Nam; [2]College of Agriculture, Can Tho University, Viet Nam*

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định tác nhân vi khuẩn gây bệnh xuất huyết đường ruột trên cá lóc (Channa striata), từ đó cung cấp những thông tin cho việc chẩn đoán, phòng và điều trị bệnh hiệu quả. Tổng cộng 250 mẫu cá lóc được thu với 200 mẫu cá bệnh và 50 mẫu cá khỏe ở Đồng Tháp từ tháng 12/2022 đến tháng 5/2023, có trọng lượng khoảng 226,5 g và chiều dài khoảng 22,8 cm. Cá lóc bệnh xuất huyết đường ruột có dấu hiệu bệnh lý đặc trưng như màu sắc nhợt nhạt, xuất huyết dạng điểm rải rác; ruột bị xuất huyết, chuyển thành màu hồng đến đỏ. Kết quả phân lập, định danh vi khuẩn và thí nghiệm cảm nhiễm gây bệnh cho thấy, cá lóc bị bệnh xuất huyết đường ruột là do loài vi khuẩn Aeromonas veronii gây ra với giá trị độc lực LD50 của 2 chủng vi khuẩn AV9 và AV39 lần lượt là 4,82×105 CFU/mL và 8,36×105 CFU/mL.

Từ khóa: *Aeromonas veronii, bệnh xuất huyết, Channa striata*

ABSTRACT

This study was to determine the pathogen of bacteria that causes hemorrhagic intestinal disease in snakehead fish (C. striata) and to provide information for effective diagnosis, prevention, and treatment of the disease. A total of 250 samples were collected in Dong Thap province, from December, 2022 to May, 2023. There were 200 diseased fish samples and 50 healthy fish samples, in which diseased fish samples had an average weight of about 226.5g and an average length of about 22.8cm. Snakehead fish with the intestine hemorrhagic disease had typically pathological signs of pale color, scattered spot hemorrhage on the body skin; the intestine were hemorrhagic, which had turned pink or red. The results of isolation, identification of bacteria and experimental infections showed that the causative agent of intestine hemorrhagic disease in snakehead fish was Aeromonas veronii. The experimental infections recorded that the median lethal dosage (LD50) of the two bacterial strains AV9 and AV39 were 4.82×10^5 CFU/mL and 8.36×10^5 CFU/mL, respectively.

Keywords: *Aeromonas veronii, Channa striata, hemorrhagic disease*

1. GIỚI THIỆU

Nghề nuôi cá lóc đen (*C. striata)* ở vùng Châu Đốc và Hồng Ngự bắt đầu được quan tâm phát triển từ giữa thập kỷ trước năm 1990. Hiện nay, loài cá lóc đen (*Channa striata*) là đối tượng nuôi chính trong cơ cấu đàn cá lóc nuôi ở vùng đồng bằng sông Cửu Long, sản lượng nuôi tập trung chủ yếu ở các tỉnh An Giang, Đồng Tháp, Cần Thơ, Trà Vinh và Kiên Giang (Le & Do, 2010).

Cá lóc đen là loài cá có kích thước lớn, tăng trưởng nhanh, được chú ý nghiên cứu và đẩy mạnh phát triển do dễ nuôi, kích cỡ lớn, thịt thơm ngon, giá trị kinh tế cao (Nguyen & Duong, 2008). Tuy nhiên, đa số các hộ nuôi cá lóc ở các tỉnh ĐBSCL nuôi theo phong trào tự phát, nhỏ lẻ làm phát sinh rất nhiều vấn đề cần phải quan tâm giải quyết, nhất là tình hình bệnh xảy ra phức tạp (Le & Do, 2010), trong đó bệnh do vi khuẩn là phổ biến nhất và gây thiệt hại nghiêm trọng cho nghề nuôi (Nguyen et al., 2022).

Điều kiện nuôi chất lượng nước và dinh dưỡng kém sẽ làm bùng phát mầm bệnh trong ao nuôi cá lóc. Trong nhiều tác nhân gây bệnh như ký sinh trùng, nấm, vi rút thì mầm bệnh vi khuẩn thường xuyên gây ra nhiều dạng bệnh khác nhau như bệnh đốm đỏ, xuất huyết, gan thận mủ, gây thiệt hại nghiêm trọng cho đàn cá. Từ những năm 1985, đã có những báo cáo ghi nhận về một bệnh nhiễm trùng huyết cấp tính do vi khuẩn gây ra ở cá lóc *C. maculata* nuôi ao bùng phát ở Đài Loan (Tung et al., 1985). Trong những năm vừa qua, các bệnh do vi khuẩn thuộc giống *Aeromonas, Pseudomonas, Streptococcus, Edwardsiella* đã được nhiều tác giả ghi nhận là tác nhân gây bệnh nghiêm trọng trên nhiều loài cá lóc (Noga, 2010; Pham et al., 2012; Zheng et al., 2012; Dang & Nguyen, 2016; Nguyen & Dang, 2017; Tu et al., 2019; Eid et al., 2019; Zhang et al., 2019; Nguyen et al., 2022). Tuy nhiên, gần đây, cá lóc nuôi ở tỉnh Đồng Tháp thường xảy ra bệnh với các dấu hiệu bệnh lý như các đốm xuất huyết trên bề mặt cơ thể cá, gan, thận nhạt màu, xuất huyết và đặc biệt là ruột cá chuyển màu đỏ. Những dấu hiệu bệnh lý này không giống với những mô tả trong nghiên cứu của Pham et al. (2012), Pham et al. (2013), và vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* là tác nhân gây bệnh xuất huyết trên cá lóc. Trong lúc nghề nuôi phát triển nhanh chóng, diễn biến dịch bệnh ngày càng phức tạp thì việc hiểu rõ về các tác nhân vi khuẩn gây bệnh xuất huyết càng trở nên cấp thiết. Vì thế, nghiên cứu được thực hiện.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp thu mẫu cá

Cá lóc có biểu hiện bệnh, bao gồm xuất huyết mảng/chấm trên da, lở loét da; gan, thận, tỳ tạng và ruột xuất huyết, đỏ bầm được nuôi trong ao ở các hộ nuôi cá lóc thuộc huyện Hồng Ngự, Cao Lãnh và Sa Đéc thuộc tỉnh Đồng Tháp. Cá được thu ở 25 ao, mỗi ao thu 8 con cá lóc có biểu hiện bệnh xuất huyết và 2 con cá khỏe. Cá được giữ sống trong thùng xốp có sục khí, vận chuyển về phòng thí nghiệm Khoa Bệnh học Thủy sản, Trường Thuỷ sản, Trường Đại học Cần Thơ và tiến hành phân tích mẫu trong ngày, hoặc có thể phân tích mẫu cá tại hiện trường thu mẫu (50 mẫu).

2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn

Cá được phân tích mẫu theo phương pháp của Frerichs and Millar (1993). Quan sát và ghi nhận dấu hiệu bệnh lý bên ngoài. Dùng cồn 70^o sát trùng bên ngoài cá, lau sạch, mổ xoang bụng, quan sát và ghi nhận dấu hiệu bên trong. Phân lập vi khuẩn bằng cách rạch một đường ở gan, ruột, thận và tỳ tạng bằng dao tiệt trùng, dùng que cấy lấy mẫu bệnh phẩm từ chỗ vừa rạch và cấy lên môi trường TSA (Tryptone soya agar). Mẫu cấy được ủ ở nhiệt độ 28°C. Sau 24-48 giờ, ghi nhận màu sắc, hình dạng khuẩn lạc. Chọn những khuẩn lạc rời rạc và hình dạng đặc trưng để tách ròng, tiếp tục cấy truyền để tạo dòng thuần chủng. Định danh và lưu giữ vi khuẩn.

2.3. Phương pháp định danh vi khuẩn

Các khuẩn lạc điển hình, chiếm đa số được làm thuần. Hình dạng, kích thước và tính ròng của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram. Đặc điểm sinh lý sinh hóa của 60 chủng vi khuẩn được xác định theo cẩm nang của Cowan and Steel's (Barrow & Feltham, 1993). Việc định danh 6 chủng vi khuẩn được thực hiện bằng bộ kit API 20E. Hai chủng từ các mẫu cá bệnh điển hình nhất được chọn, có đặc tính sinh hóa của loài rõ rệt nhất, để định danh bằng phương pháp sinh học phân tử và giải trình tự gen 16S rDNA.

2.4. Phương pháp sinh học phân tử xác định loài vi khuẩn *A. veronii*

Mười sáu chủng vi khuẩn điển hình được chọn để thực hiện quy trình PCR xác định loài vi khuẩn *A. veronii* (phương pháp của Li et al. (2020)) như sau:

Các chủng vi khuẩn sau khi nuôi cấy thuần chủng được cấy vào môi trường dinh dưỡng tăng sinh lỏng NB (Nutrient Broth). Việc ly trích DNA

bộ gen của vi khuẩn được thực hiện bằng bộ kít (Beijing Solarbio Cable Technology Co., Trung Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sau đó bảo quản ở -20ºC.

Thành phần hoá chất tham gia phản ứng bao gồm (25 µL): 0,5 µL mẫu (DNA bộ gen của vi khuẩn); 2,5 µL 10 × PCR Buffer; 0,5 µL 5 U/L TaqDNA polymerase; 2 µL 2mmol/L dNTPs; 10 µM mồi (mỗi loại 0,5 µL) và ddH2O. DNA của mẫu *A. veronii* chủng chuẩn ATCC 35624 đóng vai trò là đối chứng dương và DNA mẫu *A. hydrophila* ATCC 7966 đóng vai trò là đối chứng âm.

Điều kiện phản ứng như sau: 94°C trong 5 phút; 30 chu kỳ 94°C trong 30 giây, 56°C trong 30 giây và 72°C trong 45 giây; 72°C trong 10 phút và nhiệt độ cuối cùng là 4°C. Chủng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1%. Các chủng dương tính được xác định nhờ sự hiện diện của một sản phẩm điện di có kích thước 886 bp (sử dụng hệ thống Gel Documentation - Carestream health, INC).

Trình tự mồi tham gia phản ứng bao gồm:

P1: 5’ GGGATAACTACTGGAAACGGTA 3’

P2: 5’ GAAGGCACTCCCGTATCTCTA 3’

Sản phẩm PCR sau khi kiểm tra, nghiên cứu chọn ra 2 mẫu PCR đại diện cho 2 chủng vi khuẩn phân lập từ cá lóc bệnh xuất huyết đường ruột để tiến hành giải trình tự gen. Hai mẫu sản phẩm PCR này được tinh sạch bằng bộ KIT Isolate II PCR and Gel (BioLine, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được gửi đến công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa để giải trình tự gen bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Mức độ tương đồng của đoạn gen của hai chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này được so sánh với trình tự của các đoạn gen được đăng ký trên ngân hàng gen bằng chương trình BLAST (Basic Local Alighment Search Tool) trên GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) để định danh vi khuẩn đến loài. Sau đó, trình tự gen của hai chủng vi khuẩn phân lập từ cá lóc bệnh xuất huyết đường ruột được đăng ký trên GenBank với số tham chiếu là OR461523, OR461524.

2.5. Thí nghiệm cảm nhiễm vi khuẩn trên cá lóc

2.5.1. Chuẩn bị thí nghiệm

Hệ thống bể:

Bể Composite được vệ sinh kỹ bằng xà phòng và chlorine 200 ppm, phơi khô. Đối với bể 1 m^3 để trữ cá, nước được cấp khoảng 2/3 bể, sục khí 1-2 ngày trước khi thí nghiệm. Bể được đặt ngoài trời có mái che. Đối với bể thí nghiệm 60L, nước được cấp khoảng 40L, sục khí, sử dụng nguồn nước máy. Bể được đặt trong phòng kín, nhiệt độ phòng 26-28°C.

Cá thí nghiệm:

Cá lóc giống khỏe có da sáng và phản ứng linh hoạt với tiếng động được chọn, cá có khối lượng khoảng 10±2 g/con. Cá mua về được trữ trong bể composite, có sục khí, cho ăn thức ăn công nghiệp và cho ăn theo nhu cầu của cá, thuần dưỡng khoảng 1-2 tuần trước khi tiến hành thí nghiệm.

Vi khuẩn thí nghiệm:

a. Phục hồi vi khuẩn

Hai chủng vi khuẩn (AV9 và AV39) đã định danh được chọn để tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm. Vi khuẩn được phục hồi trên môi trường TSA và ủ ở 28°C. Sau 24 giờ, quan sát hình dạng, màu sắc khuẩn lạc, nhuộm Gram kiểm tra tính thuần của vi khuẩn.

b. Chuẩn bị vi khuẩn thí nghiệm

Nuôi tăng sinh vi khuẩn: Sau khi thu được vi khuẩn thuần, que cấy tiệt trùng được dùng để lấy khoảng 1-2 khuẩn lạc cho vào chai chứa 30 mL môi trường BHI-B (Brain Heart Infusion Broth) đã tiệt trùng, đặt lên máy lắc 200 vòng/phút trong 24 giờ. Sau 24 giờ, vi khuẩn được chuyển sang ống falcol 50 mL tiệt trùng và đem ly tâm 4000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút. Sau khi ly tâm, dung dịch phía trên được loại bỏ và dùng nước muối sinh lý (NaCl 0,85%) tiệt trùng để rửa vi khuẩn (ly tâm lặp lại 2-3 lần).

Lần ly tâm cuối, phần dung dịch phía trên được loại bỏ, tiếp tục cho vào khoảng 25 mL dung dịch nước muối sinh lý tiệt trùng, sau đó trộn mẫu bằng máy vortex. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ với bước sóng 610 nm và điều chỉnh OD tương ứng để xác định mật độ vi khuẩn. OD = 1±0,1 tương ứng với mật độ vi khuẩn là 10^9 CFU/ml. Sau đó, dung dịch vi khuẩn được pha loãng đến các nồng độ thí nghiệm cần thiết. Mật độ vi khuẩn của từng nghiệm thức được tái khẳng định bằng phương pháp trải dung dịch vi khuẩn trên đĩa thạch.

2.5.2. Bố trí thí nghiệm

Cá được kiểm tra xem có nhiễm ký sinh trùng và vi khuẩn hay không trước khi tiến hành thí nghiệm. Mười mẫu cá (trong bể dưỡng) được kiểm tra đều cho kết quả không nhiễm ký sinh trùng hay mầm bệnh vi khuẩn trong cơ thể.

Thí nghiệm được bố trí 5 nghiệm thức. Ba nghiệm thức có tiêm vi khuẩn với mật độ lần lượt là 10^3, 10^5, 10^7 CFU/mL, 1 nghiệm thức đối chứng không tiêm vi khuẩn và 1 nghiệm thức đối chứng tiêm nước muối sinh lý. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần với mật độ cá thí nghiệm là 10 con/bể. Cá được tiêm vi khuẩn ở gốc vi bụng, tiêm 0,1 ml/cá thể, cho ăn suốt quá trình thí nghiệm. Thời gian theo dõi là 14 ngày.

2.5.3. Phương pháp xác định LD50 (Lethal dose - nồng độ vi khuẩn gây chết cá 50%)

Xác định LD50 theo phương pháp của Reed and Muench (1938) theo công thức:

$$LD_{50} = 10^{\,a+p.d}$$

Trong đó: $p.d = \frac{50\%-H\%}{L\%-H\%}$

a: số lũy thừa của mật độ vi khuẩn gây chết dưới và cận 50%; H%: tỉ lệ chết nhỏ và cận 50%; L%: tỉ lệ chết trên và cận 50%.

2.6. Tái phân lập và tái định danh vi khuẩn

Mẫu cá lờ đờ của các thí nghiệm gây cảm nhiễm được thu, ghi lại thời gian, dấu hiệu bên ngoài và bên trong cơ thể mẫu cá. Vi khuẩn được phân lập ở các cơ quan như gan, thận, tỳ tạng và ruột. Sau 24 giờ ủ ở 28-30°C, ta quan sát hình dạng, kích thước, màu sắc khuẩn lạc trên môi trường TSA, nhuộm Gram, xác định hình dạng, kích thước và khả năng di động của vi khuẩn. Phản ứng oxidase, catalase, khả năng lên men và oxy hóa Glucose (O/F) được kiểm tra.

Vi khuẩn được định danh theo phương pháp của Cowan and Steel's (Barrow & Feltham, 1993). Các đặc điểm về hình thái, sinh lý và sinh hóa của vi khuẩn được xác định thông qua kiểm tra các chỉ tiêu cơ bản và sử dụng bộ kít API 20E (Microbank™, PRO-LAB Diagnostics, UK).

Định danh bằng phương pháp sinh học phân tử (PCR) và giải trình tự đoạn gen.

2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được thu thập và xử lý (vẽ đồ thị, lập biểu bảng, viết bài báo) bằng phần mềm Microsoft Excel và Microsoft Word. So sánh thống kê bằng SPSS 16.0. Cây phát sinh loài được xây dựng theo phương pháp Neighbor-Joining Tree, sử dụng phần mềm MEGA 11. Tất cả các chuỗi tham chiếu được lấy từ cơ sở dữ liệu GenBank.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu mẫu cá lóc bệnh xuất huyết

3.1.1. Thông tin về mẫu cá lóc

Mẫu cá lóc ở 25 ao nuôi được tiến hành thu, thu mẫu cá có dấu hiệu bệnh xuất huyết và cá khỏe để làm mẫu đối chứng.

Qua 6 tháng thu mẫu, từ tháng 12/2022 đến tháng 05/2023, nghiên cứu đã thu được tổng cộng 250 mẫu cá (200 cá bệnh và 50 cá khỏe) ở giai đoạn bệnh phát triển mạnh. Phần lớn các mẫu cá bệnh có biểu hiện lờ đờ, bỏ ăn và chết, cá có dấu hiệu bệnh xuất huyết đường ruột.

Kết quả thu mẫu cho thấy, cá lóc nuôi thâm canh phát hiện bệnh trong giai đoạn từ 30 đến 60 ngày tuổi, những ao nuôi có diện tích khoảng 500 m^2, mật độ thả nuôi từ 80 đến 90 con/m^2. Mẫu cá lóc thu được có trọng lượng dao động từ 103,0 đến 345,0 g, trung bình khoảng 226,5 g. Chiều dài trung bình khoảng 22,8 cm, chiều dài nhỏ nhất được ghi nhận là 13,1 cm và cao nhất là 33,0 cm.

3.1.2. Dấu hiệu bệnh lý của cá lóc bị bệnh xuất huyết

Theo thông tin ghi nhận được từ người nuôi, mức độ thiệt hại của bệnh xuất huyết khá lớn ở cả giai đoạn cá giống và thương phẩm. Bệnh xảy ra trên hầu hết các giai đoạn cá và có xu hướng gia tăng tỉ lệ nhiễm vào tháng 1 đến tháng 5 hàng năm. Cá bệnh thường chết khoảng 1-2%/ngày ở giai đoạn mới khởi phát. Khi bệnh nhiễm nặng, thời điểm 4-5 ngày sau khi khởi phát, đàn cá bệnh chết từ 10 đến 20 %/ngày nếu không được điều trị kịp thời.

Dấu hiệu bệnh lý bên ngoài: Quan sát hoạt động của những cá bệnh trong ao cho thấy cá bơi lội chậm chạp, lờ đờ, bơi nổi nghiêng, nổi đứng trên mặt nước, tấp vào mé ao và thường ăn ít hoặc bỏ ăn. Cơ thể cá nhạt màu, các vây ngực, vây hậu môn bị rách hoặc tưa.



Hình 1. Dấu hiệu bên ngoài cá lóc khỏe (A), cá bệnh xuất huyết (B)

Ở những mẫu cá bệnh nặng, những vết xuất huyết dạng chấm nhỏ, xuất hiện từ vùng hậu môn kéo dài đến vùng vây bụng. Điểm khác biệt nhất có thể nhận ra dạng bệnh xuất huyết là hiện tượng xuất huyết những đốm đỏ nhỏ, rải rác dưới da, miệng, mắt và trên các vây, chiếm 52% tổng số mẫu cá bệnh. Còn dạng xuất huyết với các mảng lớn đỏ bầm chỉ ghi nhận khoảng 4,5% mẫu cá thu được.

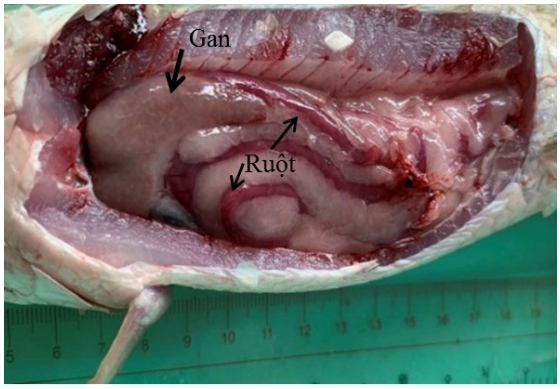
Dấu hiệu bệnh lý bên trong: Quan sát bên trong xoang bụng của cá lóc bệnh xuất huyết cho thấy nội quan xuất huyết và xoang bụng có chứa chất dịch máu đỏ. Các cơ quan gan, thận, tỳ tạng có dấu hiệu xuất huyết, chiếm 24,5% tổng số mẫu cá bệnh. Hầu hết các mẫu cá lóc bệnh xuất huyết có biểu hiện ruột bị xuất huyết, toàn bộ phần ruột tiếp giáp dạ dầy trải dài đến hậu môn chuyển thành màu đỏ, chiếm 61,5% tổng số mẫu cá bệnh. Ngoài ra, một số mẫu cá lóc cũng có dấu hiệu gan nhạt màu và mềm nhũng, tỳ tạng bầm đen trong khi ruột thì có màu hồng đỏ.



Hình 2. Dấu hiệu bên trong cá lóc khỏe (A), cá bệnh xuất huyết (B, mũi tên)



Hình 3. Gan xuất huyết, tỳ tạng bầm đen và ruột đỏ hồng ở cá lóc bệnh (mũi tên)



Hình 4. Gan nhạt, ruột đỏ bầm ở cá lóc bệnh

3.2. Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn

3.2.1. Kết quả phân lập vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được phân lập từ các cơ quan gan, thận, tỳ tạng và ruột trên môi trường TSA. Sau 24 giờ, vi khuẩn tạo thành những khuẩn lạc tương đồng nhau với hình dạng tròn, nhỏ, lồi, rìa trơn láng, màu kem, đường kính 0,5-1,0 mm.

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn từ cá lóc bị bệnh xuất huyết đường ruột

Cơ quan phân lập	Số chủng phân lập	Tỷ lệ (%)
Gan	44	22,8
Thận	42	21,8
Tỳ tạng	19	9,8
Ruột	88	45,6
Tổng	193	100,0

Bảng 2 cho thấy kết quả phân lập từ 200 mẫu cá bệnh thu được 193 chủng vi khuẩn. Theo đó, các chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu bệnh phẩm ruột cá chiếm 45,6%, kế đến là gan và thận cá với số chủng vi khuẩn chiếm lần lượt là 22,8% và 21,8%, không phân lập được vi khuẩn trên các mẫu cá khoẻ.

3.2.2. Kết quả định danh vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn thuần được kiểm tra các chỉ tiêu sinh hóa cơ bản gồm nhuộm Gram, oxidase, catalase, O/F, di động. Đặc điểm sinh hóa cơ bản của 60 chủng vi khuẩn được tổng hợp trong Bảng 3.

Kết quả kiểm tra đặc điểm sinh hoá cơ bản của 60 chủng cho thấy đây là những chủng vi khuẩn Gram âm, hình que ngắn, dương tính với catalase, oxidase và có khả năng lên men trong cả điều kiện hiếu khí và yếm khí, kháng với O/129. Vi khuẩn di động mạnh ở 37°C. Ngoài ra, các chủng vi khuẩn này còn phát triển thành những khuẩn lạc có màu vàng trên môi trường GSP (Glutamate Starch Phenol Red Agar) (Hình 6). Kết quả ban đầu đã xác

định vi khuẩn thuộc giống vi khuẩn *Aeromonas* di động. Để định danh đến loài, nghiên cứu chọn ngẫu nhiên 6 chủng vi khuẩn tiếp tục thử với 20 chỉ tiêu sinh hoá của bộ kít API 20E. Kết quả các chủng vi khuẩn đều sinh indol, chỉ sử dụng đường mannitol và glucose, không sử dụng các loại đường khác. Đồng thời, cho phản ứng dương tính với arginine, VP và phản ứng âm tính với ornithine và lysine. Từ kết quả API 20E, ta có thể xác định các chủng vi khuẩn phân lập được từ cá lóc bị bệnh xuất huyết đường ruột là loài *Aeromonas veronii*.

Bảng 2. Đặc điểm sinh hóa cơ bản của vi khuẩn phân lập từ cá lóc bệnh xuất huyết đường ruột

Chỉ tiêu	Chủng từ cá lóc	Chủng chuẩn
Hình dạng	que ngắn	que ngắn
Gram	-	-
Di động	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
O/F	+	+
O/129	Kháng	Kháng

Thêm vào đó, dựa theo phương pháp định danh loài vi khuẩn của Bergey's (Breed et al., 1957), các đặc điểm sinh hóa của 6 chủng vi khuẩn này hoàn toàn phù hợp với đặc điểm sinh hóa của loài *A. veronii*. Mặt khác, các đặc điểm sinh hóa của các chủng phân lập được cũng có nhiều đặc tính tương đồng với chủng *A. veronii* chuẩn ATCC 35624 và các chủng *A. veronii* tham khảo từ Cheng et al. (2016). Ngoài ra, dựa vào mô tả về dấu hiệu bệnh lý bệnh do vi khuẩn *A. veronii* gây ra trên giống cá lóc của Zheng et al. (2012), Estrada et al. (2019), Wang et al. (2020) như xuất huyết ở vây hậu môn và cơ quan nội tạng, gan nhạt màu, ruột viêm có màu đỏ đậm, thận, tỳ tạng xuất huyết đỏ bầm, nhũn, có dịch trong xoang bụng thì dấu hiệu bệnh lý mà nghiên cứu ghi nhận được khá tương đồng.

Ngày càng có nhiều chủng *A. veronii* được phân lập từ cá bệnh (Nguyen, 2023). Vi khuẩn này không tạo bào nang, nhiệt độ thích hợp là 28°C, có thể phát triển ở 37°C. Khuẩn lạc trên môi trường NA có màu trắng đến hồng nhạt, tròn, lồi, rìa trơn. Trên môi trường đặc trưng GSP, chúng tạo thành những khuẩn lạc màu vàng, to, trơn láng ủ ở 28°C sau 24 giờ. Catalase, oxidase dương tính. Vi khuẩn kị khí không bắt buộc, lên men đường. Vi khuẩn *Aeromonas* spp. dương tính với O/F, nitrate dương tính, không thể phát triển trong môi trường chứa 6,5% NaCl và kháng tự nhiên với ampicillin và O/129 (Noga, 2010; Nguyen, 2023). Vi khuẩn được phân lập từ bệnh phẩm ở gan, thận, tỳ tạng và cả trên cơ của cá nuôi. Các chỉ tiêu sinh hóa cơ bản để phân biệt *A. hydrophila, A. caviae, A. sobria* và *A. veronii* gồm thủy phân asculin, lysine decarboxylation, VP, indole và gas từ glucose. Những ghi nhận trên cho thấy kết quả sinh hóa của các chủng vi khuẩn mà nghiên cứu ghi nhận hoàn toàn phù hợp với loài *A. veronii*.

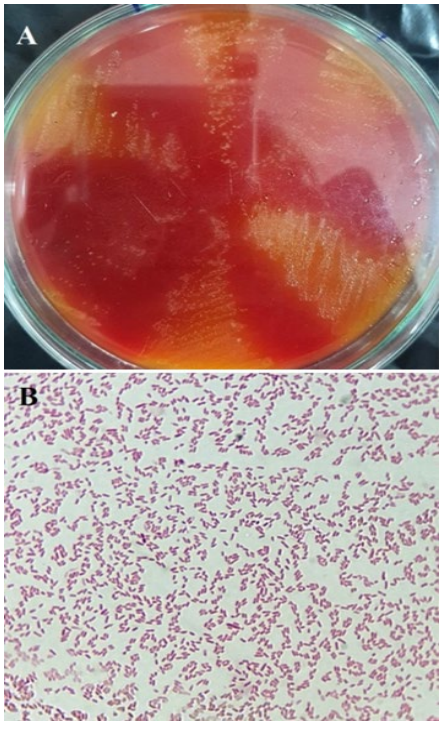
Bảng 3. Kết quả kiểm tra các chỉ tiêu sinh hóa bằng bộ kit API 20E

Chỉ tiêu	Chủng phân lập từ cá lóc AV9	Chủng chuẩn ATCC 35624	Chủng tham khảo từ Cheng et al. (2016)
ONPG	+	+	+
ADH	+	+	+
LDC	-	-	-
ODC	-	-	-
CIT	+	-	-
H_2S	-	-	-
URE	-	-	-
TDA	+	-	-
IND	+	+	+
VP	+	+	+
GEL	+	+	+
GLU	+	+	+
MAN	+	+	+
INO	-	-	-
SOR	-	-	-
RHA	-	-	-
SAC	-	+	+
MEL	-	-	-
AMY	-	-	-
ARA	-	+	+

Ghi chú: Đặc điểm sinh hóa của 6 chủng vi khuẩn như nhau với kết quả của chủng AV9 làm đại diện.

Trong những năm gần đây loài *A. veroni* ngày càng lây nhiễm cho cá (Chen et al., 2019). Các kết quả ghi nhận của Pei et al. (2021) trên một số trường hợp cá *Micropterus salmoides* nhiễm *A. veronii* cũng có những điểm tương đồng trong đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn mà nghiên cứu ghi nhận được. *A. veronii* cũng được phân lập từ cá bệnh và được xác định là tác nhân gây bệnh chính. Các dấu hiệu lâm sàng của cá bệnh là xuất huyết trên nắp mang và vây, lở loét trên vây lưng và bụng, thối vây. Vi khuẩn được phân lập là vi khuẩn Gram âm, hình que. Các khuẩn lạc có màu da bò, mờ, tròn, lồi và mép nguyên vẹn. Các chủng vi khuẩn cũng cho phản ứng sinh hóa dương tính với citrate, oxidase, lysine decarboxylase, Voges-Proskauer, indole nhưng âm tính với arginine.

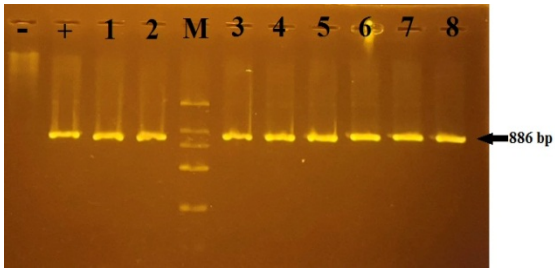
Gần đây, nghiên cứu của Chen et al. (2023) đã ghi nhận các triệu chứng lâm sàng của cá trắm bạc *Hypophthalmichthys molitrix* bị bệnh xuất huyết do *A. veronii* là chướng bụng, xung huyết hậu môn, dịch xoang bụng, gan và tỳ tạng của cá bị sưng, sẫm màu. Các chủng *A. veronii* được phân lập từ cá bệnh ngoài tự nhiên này cũng có các đặc điểm khuẩn lạc như màu kem, nhỏ, bề mặt nhẵn, mờ, hơi lồi và có viền đều trên đĩa thạch. Chủng vi khuẩn này là vi khuẩn Gram âm, hình que ngắn, không có bào tử. Các đặc tính sinh lý và sinh hóa của các chủng này giống như các chủng vi khuẩn mà nghiên cứu phân lập được. Kết quả thủy phân esculin và ornithine decarboxylase là dương tính, còn kết quả arginine dihydrolase và L-arabitol là âm tính. Kết quả của nghiên cứu này cũng ghi nhận các chủng *A. veronii* dương tính với citrate, tương đồng với các chủng vi khuẩn *A. veronii* mà nghiên cứu phân lập được trên cá lóc. Từ những ghi nhận trên cho thấy, loài vi khuẩn *A. veronii* đã có sự mở rộng phổ loài cảm nhiễm trên các đối tượng cá nuôi ở khắp nơi trên thế giới.



Hình 5. Khuẩn lạc trên môi trường GSP (A) và hình nhuộm Gram (B) của vi khuẩn phân lập từ cá lóc bệnh xuất huyết đường ruột

3.3. Kết quả phân tích PCR và giải trình tự gen

Nghiên cứu chọn ra 16 chủng vi khuẩn phân lập từ cá lóc bệnh để phân tích PCR, sau đó sử dụng sản phẩm khuếch đại để giải trình tự gen của các chủng vi khuẩn nhằm xác định chính xác tên loài vi khuẩn. Kết quả điện di sản phẩm PCR ghi nhận mẫu hiện vạch 886 bp, cho kết quả dương tính với vi khuẩn *A. veronii*, kết quả này tương tự kết quả sản phẩm PCR của Li et al. (2020). Sản phẩm PCR dương tính với *A. veronii* được đem đi giải trình tự gen theo phương pháp của Sanger.



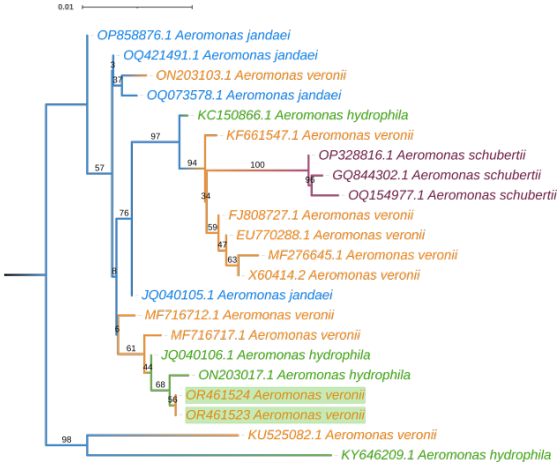
Hình 6. Kết quả PCR phát hiện vi khuẩn *A. veronii* phân lập từ cá lóc bệnh

Các giếng bao gồm: giếng M: thang DNA, giếng –: đối chứng âm, giếng +: đối chứng dương; giếng 1-8: thứ tự các mẫu vi khuẩn phân lập từ cá lóc bệnh

Kết quả giải trình tự 2 sản phẩm PCR của 2 chủng vi khuẩn AV9 và AV39 phân lập từ cá lóc bệnh xuất huyết đường ruột cho thấy, sản phẩm sau khi khuếch đại có tổng cộng 886 nucleotit. Trình tự này được so sánh với các trình tự gen trên ngân hàng gen bằng chương trình BLASTN. Kết quả so sánh các trình tự gen cho thấy mẫu vi khuẩn phân lập từ cá lóc bị bệnh xuất huyết đường ruột tương đồng với trình tự gen của loài *Aeromonas veronii* được đăng trên ngân hàng gen NCBI (mã số: MF716712.1) với mức độ tương đồng là 99,66%. Trình tự này được đăng trên ngân hàng gen do nhóm tác giả Xu et al. (2017), phân lập được từ nước ao nuôi loài cá *Paramisgurnus dabryanus* ở Trung Quốc vào năm 2017. Thêm vào đó, các trình tự gen của mẫu vi khuẩn phân lập từ cá lóc bị bệnh xuất huyết đường ruột cũng tương đồng với trình tự gen của chủng vi khuẩn *A. veronii* chuẩn ATCC 35624 được đăng trên ngân hàng gen NCBI (mã số: X60414.2) với mức độ tương đồng là 99,1%. Kết quả so sánh trình tự gen trên ngân hàng gen kết hợp với những kết quả của bộ kít API 20E cho thấy, có thể kết luận rằng các chủng vi khuẩn phân lập được từ cá lóc bị bệnh xuất huyết đường ruột là loài *Aeromonas veronii*.

Trình tự gen của 2 chủng vi khuẩn *A. veronii* AV9 và AV39 thu từ cá lóc bị bệnh xuất huyết đường ruột đã được nghiên cứu đăng ký trên ngân hàng gen của NCBI với mã số truy cập là: OR461523, OR461524. Từ 2 phiên bản trình tự này, cây phát sinh loài được xây dựng, sử dụng các chuỗi

tham chiếu lấy từ cơ sở dữ liệu GenBank. Cây phát sinh loài xây dựng từ các trình tự gen đã chứng minh trình tự của 2 chủng vi khuẩn *A. veronii* thu từ cá lóc bị bệnh xuất huyết ruột đỏ (mã số: OR461523, OR461524) tách biệt rõ ràng với các trình tự vi khuẩn cùng loài đã được báo cáo trước đó và hình thành nhánh đơn của riêng nó. Đáng chú ý, cây phát sinh loài cho thấy chủng vi khuẩn mà nghiên cứu phân lập được có mối quan hệ tiến hóa gần nhất với các chủng *Aeromonas hydrophila* thu từ tôm hùm nước ngọt *Procambarus clarkii* ở Trung Quốc năm 2021 (mã số: ON203017.1) và các chủng *A. hydrophila* thu từ cá chình ở Trung Quốc năm 2011 (mẫu JQ040106.1). Điều đặc biệt là các mẫu gen của các chủng vi khuẩn *A. veronii* khác được thu tại Trung Quốc, Ấn Độ, Israel có khoảng cách tiến hóa khá xa so với mẫu gen của chủng vi khuẩn *A. veronii* thu tại Việt Nam. Thêm vào đó, kiểu gen của chủng chuẩn ATCC 35624 (mã số: X60414.2) cũng có khoảng cách tiến hóa khá xa so với các chủng vi khuẩn mà nghiên cứu thu được. Điều này có thể giải thích cho kết quả có phần khác biệt khi kiểm tra các chỉ tiêu sinh hóa trong bộ kit API 20E đã được trình bày ở trên.



Hình 7. Cây phát sinh loài của 2 chủng vi khuẩn *A. veronii* nhiễm trên cá lóc bệnh ở Đồng Tháp (mã số: OR461523, OR461524)

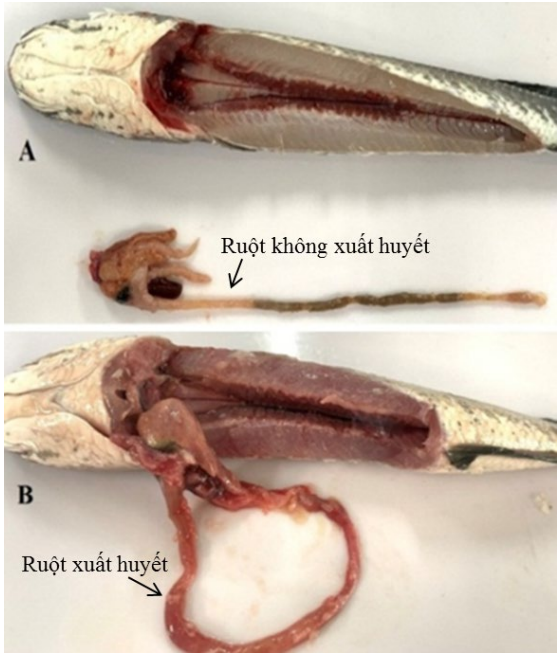
3.4. Kết quả cảm nhiễm vi khuẩn *A. veronii*

3.4.1. Dấu hiệu bệnh lý của cá cảm nhiễm

Thí nghiệm cảm nhiễm vi khuẩn *A. veronii* trên cá lóc được thực hiện với hai chủng vi khuẩn AV9 và AV39. Thí nghiệm bố trí 2 nghiệm thức đối chứng và 3 nghiệm thức tiêm vi khuẩn ở nồng độ là 10^3, 10^5, 10^7 CFU/ml cho cá lóc giống, trọng lượng cá dao động từ 30 đến 80 g, chiều dài dao động từ 14 đến 20 cm.



Hình 8. Dấu hiệu bệnh lý bên ngoài của cá lóc được tiêm vi khuẩn ở nghiệm thức nồng độ 10^5 CFU/ml (B) so với cá khỏe ở nghiệm thức đối chứng (không tiêm) (A)



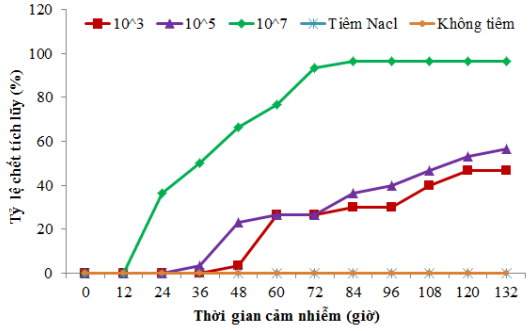
Hình 9. Dấu hiệu bệnh lý bên trong của cá lóc được tiêm vi khuẩn ở nghiệm thức nồng độ 10^7 CFU/ml (B) so với cá khỏe ở nghiệm thức đối chứng (không tiêm) (A)

Dấu hiệu bệnh lý của mẫu cá lóc chết trong thí nghiệm cảm nhiễm ở các nghiệm thức tương tự như dấu hiệu bệnh lý cá lóc bệnh xuất huyết đường ruột thu từ các ao nuôi cá lóc thâm canh tại tỉnh Đồng Tháp. Ở tất cả 3 nghiệm thức tiêm vi khuẩn, sau khi tiêm 24 giờ, cá cảm nhiễm có các dấu hiệu bất thường như bơi lội chậm chạp, giảm ăn và giảm vận động, cá thường bơi lờ đờ trên mặt nước. Cá lóc bắt đầu chết với với các dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của bệnh xuất huyết đường ruột. Những cá thể bệnh nặng có cơ thể nhạt màu, các vây ngực, vây hậu môn cũng bị xuất huyết điểm rải rác ở gốc vây. Vây đuôi

bị tưa, rách. Ngoài ra, ở một số cá còn có các vùng xuất huyết điểm nhỏ ở dưới bụng. Những cá chết có xoang nội quan chứa dịch màu hồng và xuất huyết xoang nội quan. Ruột cũng bị xuất huyết có màu hồng đến đỏ. Gan nhạt màu, tỳ tạng bầm đen. Thận xuất huyết và mềm nhũn.

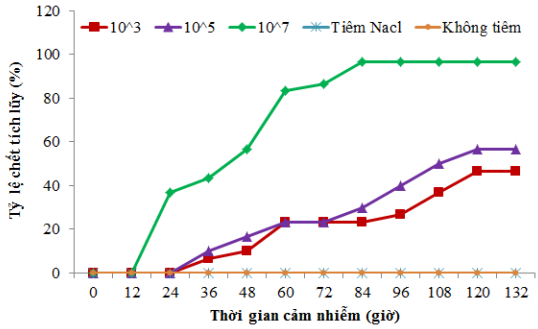
3.4.2. Giá trị LD50 của 2 chủng vi khuẩn A. veronii gây cảm nhiễm

Ở nghiệm thức không tiêm và tiêm nước muối sinh lý (NaCl 0,85%), cá vẫn trong trạng thái ổn định, không có dấu hiệu bệnh lý bất thường, không có cá chết (Hình 11, 12). Kết quả Hình 11 cho thấy, cá cảm nhiễm chủng AV9 bắt đầu chết sau 24 giờ ở nghiệm thức 10^7 CFU/mL, tỉ lệ chết 36,7%. Ở thời điểm 84 giờ sau cảm nhiễm, nghiệm thức 10^7 CFU/mL đạt mức tỉ lệ cá chết cao nhất, lên đến 96,7%. Ở nghiệm thức 10^3 CFU/mL, đến 120 giờ thì tỉ lệ cá chết đạt mức cao nhất, khoảng 46,7%. Mặt khác, nghiệm thức 10^5 CFU/ml đạt mức tỉ lệ cá chết cao nhất ở thời điểm 132 giờ, chết 56,7%. Kết quả so sánh thống kê cho thấy tỉ lệ chết tích lũy của nghiệm thức 10^7 CFU/ml khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với nghiệm thức 10^3 và 10^5 CFU/ml. Trong khi đó, nghiệm thức 10^5 CFU/ml có tỉ lệ chết tích lũy khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) so với nghiệm thức 10^3 CFU/ml. Giá trị LD50 48 giờ của chủng AV9 thu được có giá trị LD50 = $4,82\times10^5$ CFU/mL.



Hình 10. Tỉ lệ cá chết tích lũy (%) theo giờ cảm nhiễm của chủng vi khuẩn *A. veronii* AV9

Tương tự, ở thí nghiệm cảm nhiễm chủng AV39 cá bắt đầu chết vào thời điểm 24 giờ ở nghiệm thức 10^7 CFU/mL, tỉ lệ chết 36,7%. Ở thời điểm 84 giờ, nghiệm thức 10^7 CFU/mL có tỉ lệ cá chết cao nhất, lên đến 96,7%. Ở nghiệm thức mật độ vi khuẩn 10^3 CFU/mL cần đến 120 giờ thì tỉ lệ cá chết mới đạt mức cao nhất là 46,7%. Tương tự, nghiệm thức 10^5 CFU/ml cũng đạt tỉ lệ chết cao nhất ở 120 giờ là 56,7%. Kết quả so sánh thống kê cho thấy, tỉ lệ chết tích lũy của nghiệm thức 10^7 CFU/ml khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với nghiệm thức 10^3, 10^5 CFU/ml. Trong khi đó, nghiệm thức 10^5 CFU/ml có tỉ lệ chết tích lũy khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) so với nghiệm thức 10^3 CFU/ml. Giá trị LD50 48 giờ của chủng AV39 thu được trong thí nghiệm có giá trị LD50 = $8,36\times10^5$ CFU/mL.



Hình 11. Tỉ lệ cá chết tích lũy (%) theo giờ cảm nhiễm của chủng vi khuẩn *A. veronii* AV39

Cá bắt đầu chết ở các nghiệm thức vào thời điểm 24 giờ và đạt cao nhất ở thời điểm 96-132 giờ, sau đó ngừng chết. Ở tất cả các nghiệm thức tiêm vi khuẩn, tỉ lệ cá chết tích lũy trung bình ở các nồng độ không đạt 100% sau 132 giờ cảm nhiễm. Riêng đối với nghiệm thức tiêm nồng độ 10^7 CFU/mL, tỉ lệ cá chết tích lũy đạt 90% ở lần lặp lại thứ nhất và đạt 100% ở hai lần lặp lại tiếp theo. Hình các đồ thị cho thấy, cá nhiễm khuẩn và chết nhiều trong khoảng thời gian từ 36 đến 96 giờ, sau đó giảm chết và ổn định trở lại. Giá trị LD50 của hai chủng vi khuẩn mà nghiên cứu thu được cho thấy độc lực cao hơn so với những thí nghiệm được công bố trước đây. Theo đó, nghiên cứu của Chen et al. (2019) đã báo cáo về các chủng *A. veronii* phân lập từ cá *Carassius auratus* có giá trị LD50 ghi nhận được ở mức $1,31\times10^7$ CFU/mL, cao hơn giá trị LD50 mà nghiên cứu ghi nhận được, chứng tỏ các chủng vi khuẩn *A. veronii* phân lập từ cá lóc *C. striata* có độc lực cao hơn. Nghiên cứu của Wang et al. (2020) đã báo cáo về các trường hợp cá lóc *Ophiocephalus argus* bị bệnh viêm ruột với các triệu chứng lâm sàng là phần ruột bị viêm đỏ nghiêm trọng tương tự như những ghi nhận của nghiên cứu này trên cá lóc *C. striata*. Giá trị LD50 của nghiên cứu này là $2,8\times10^5$ CFU/mL cũng khá tương đồng với giá trị LD50 trong nghiên cứu này. Bên cạnh đó, các kết quả ghi nhận của Pei et al. (2021) trên một số trường hợp cá chẽm *Micropterus salmoides* nhiễm *A. veronii* có giá trị LD50 khi tiêm vào màng bụng là $3,72\times10^4$ CFU/ml và $4,5\times10^5$ CFU/mL trên loài cá *Odontobutis potamophila* (Liu et al., (2022).

3.4.3. Kết quả tái định danh vi khuẩn

Vi khuẩn được tái phân lập từ mẫu cá bệnh sau cảm nhiễm và được định danh theo phương pháp của Frerich and Millar (1993), Cowan and Steel's (Barrow & Feltham, 1993) và bộ kít API 20E. Kết quả phân lập và định danh chủng vi khuẩn gây bệnh trên đàn cá lóc cảm nhiễm có các chỉ tiêu tương đồng với kết quả định danh vi khuẩn trước đó. Hơn nữa, các chủng vi khuẩn này cũng được phân tích PCR và cho kết quả dương tính với *A. veronii* khi thể hiện vạch ở 886 bp. Từ các kết quả trên có thể kết luận rằng những chủng vi khuẩn gây bệnh trên đàn cá lóc cảm nhiễm là loài vi khuẩn *Aeromonas veronii*.

4. KẾT LUẬN

Mẫu cá lóc bệnh xuất huyết đường ruột thường có trọng lượng trung bình khoảng 226,5g và chiều dài trung bình khoảng 22,8cm. Dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của cá bệnh là có màu sắc nhợt nhạt, xuất huyết điểm rải rác, đặc biệt toàn bộ đường ruột bị xuất huyết chuyển thành màu hồng đến đỏ.

Tác nhân gây bệnh xuất huyết đường ruột (ruột đỏ) ở cá lóc được xác định là loài vi *khuẩn Aeromonas veronii*. Thí nghiệm cảm nhiễm vi khuẩn *A. veronii* bằng phương pháp tiêm ghi nhận giá trị độc lực LD50 của 2 chủng vi khuẩn AV9 và AV39 lần lượt là $4,82\times10^5$ CFU/mL và $8,36\times10^5$ CFU/mL.

LỜI CẢM TẠ

Tác giả xin gửi lời cảm ơn học viên cao học Nguyễn Minh Nguyệt, đã có nhiều đóng góp trong quá trình nghiên cứu thực nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

Barrow, G. I., & Feltham, R. K. A. (1993). *Cowan and Steel's manual for the indentification of medical bacteria*. 3rd ed. Cambridge University press. https://doi.org/10.1017/CBO9780511527104

Breed, R. S., Murray, E. G. D., & Smith, N. R. (1957). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 7th ed. The Williams & Wilkins company.

Chen, F., Sun, J., Han, Z., Yang, X., Xian, J. A., Lv, A., & Shi, H. (2019). Isolation, identification and characteristics of *Aeromonas veronii* from diseased crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Frontiers in microbiology*, *10*, 2742. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02742

Chen, H. Z., Luo, J. J., Fu, Y. W., Liu, W. D., & Zhang, Q. Z. (2023). Identification and pathogenicity of *Aeromonas veronii* isolated from sexually mature female *Hypophthalmichthys molitrix*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, *75*, 1-15. https://doi.org/10.46989/001c.74696

Cheng, A. C., Shiu, Y. L., Chenn, B. J., Huynh, T. J., & Liu, C. H. (2016). Isolation and identification of pathogenic bacterium *Aeromonas veronii* from ornamental shrimp *Caridina cf. babaulti*. *J Fish Soc Taiwan*, *43*, 273-83.

Nguyen, L. A. D, Nguyen, Q. T, Vo, N. S, Huynh, V. H, Nguyen, T. P., Do, T. T. H., Bui, T. B. H., Scippo, M. L., Quetin-Leclercq, J., Kestemont, P., Tran, M. P. (2022). The use of drugs, chemicals, herbs, and herbal extract products in grow-out farms of snakehead (*Channa striata*) and Pangasius catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in the Mekong Delta, Vietnam. *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, *5*(1), 1336-1344 *(in Vietnamese)*. https://doi.org/10.31817/vjas.2022.5.1.03

Pham, M. D, Tran, N. T., & Hatai, K. (2013). *Aeromonas hydrophila* infection in fingerlings of snakehead *Channa striata* in Viet Nam. *Fish Pathology*, *48*(2), 48-51. https://doi.org/10.3147/jsfp.48.48

Pham, M. D, Tran, N. T., & Tran, T. T. H. (2012). An investigation on pathogen infection to cultured snakehead (Channa striata) in An Giang and Dong Thap province. *Can Tho University Journal of Science*, 21b, 124-132 *(in Vietnamese)*.

Nguyen, N. D., & Dang, T. H. O. (2017). Detection of Aeromonas schubertii causing white inclusions in internal organs of snakehead fish (Channa striata) by using polymerase chain reaction. *Can Tho University Journal of Science*, 53b, 32-40 *(in Vietnamese).*

Tu, T. D., Le, M. K., & Nguyen, B. T. (1019). Isolation, identification and characterization of Aeromonas schubertii causing internal white spot on snakehead fish (Channa striata) in the Mekong Delta of Vietnam. *Can Tho University Journal of Science*, *55*(2B), 69-78 *(in Vietnamese)*.

Eid, I. I., Tan, G. Y. A., & Bhassu, S. (2019). First report of *Enterobacter soli* associated with gastro-hepato infection of farmed fish, *Channa striata* in Malaysia. *Gastroenterol Hepatol Open Access*, *10*(2), 61-65. https://doi.org/10.15406/ghoa.2019.10.00357

Estrada, F., Marcos, J. V., & Brocka, D. (2019). *Aeromonas veronii* disease in the refined snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor). *International Scholars Journals. Advances in Aquaculture and Fisheries Management*, *7*(3), 1-6.

Frerichs, G. N., & Millar, S. D. (1993). *Mannual for the isolate and indentification of fish bacterial pathogent. Institute of aquqculture*. University of Stirling.

Nguyen, T. T. H. (2023). Fish diseases. Fungal, parasitic, bacterial and viral problems. Agricultural Publishing. Ho Chi Minh City *(in Vietnamese)*.

Nguyen, H., & Duong, N. L. (2008). The hatcheries status and technical aspects for Snakehead spawning (Channa micropeltes). *Can Tho University Journal of Science*, 2, 20-28 *(in Vietnamese)*.

Li, T., Raza, S. H. A., Yang, B., Sun, Y., Wang, G., Sun, W., Qian, A., Wang, C., Kang, Y., & Shan, X. (2020). *Aeromonas veronii* Infection in Commercial Freshwater Fish: A Potential Threat to Public Health. *Animals : an open access journal from MDPI*, *10*(4), 608-619. https://doi.org/10.3390/ani10040608

Liu, G., Li, J., Jiang, Z., Zhu, X., Gao, X., Jiang, Q., & Zhang, X. (2022). Pathogenicity of *Aeromonas veronii* causing mass mortalities of *Odontobutis potamophila* and its induced host immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, *125*, 180-189. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.05.009

Noga, E. J. (2010). *Fish disease, diagnosis and treatment*. Blackwell Publishing.

Dang, T. H. O, & Nguyen, T. N. (2016). Determination of causative agent of bacillary necrosis disease in snake-head fish (Channa striata) cultured in the Mekong Delta. *Vietnam journal of Agriculture & Rural Development*, 82-89 *(in Vietnamese)*.

Pei, C., Song, H., Zhu, L., Qiao, D., Yan, Y., Li, L., & Kong, X. (2021). Identification of *Aeromonas veronii* isolated from largemouth bass *Micropterus salmoides* and histopathological analysis. *Aquaculture*, *540*, 736707. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736707

Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, *27*(3), 493-497. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408

Le, X. S., & Do, M. C. (2010). The current status and challenges facing the aquaculture of snakehead fish (Channa micropeltes and Channa striata) in the Mekong Delta. *Vietnam journal of Agriculture & Rural Development*, 2, 56-63 *(in Vietnamese)*.

Tung, M. C., Tsai, S. S., Ho, L. F., Huang, S. T., & Chen, S. C. (1985). An acute septicemic infection of Pasteurella organism in pond-cultured Formosa snakehead fish (*Channa maculata* Lacepede) in Taiwan. *Fish Pathology*, *20*(2-3), 143-148. https://doi.org/10.3147/jsfp.20.143

Wang, H., Gu, Y., Luo, G., & Cao, H. (2020). *Aeromonas veronii*, a potential pathogen of enteritis in snakehead fish *Ophiocephalus argus*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, *72*, 1-11. https://doi.org/10.46989/001c.21691

Zhang, D. X., Kang, Y. H., Song, M. F., Shu, H. P., Guo, S. N., Jia, J. P., & Shan, X. F. (2019). Identity and virulence properties of Aeromonas isolates from healthy Northern snakehead (*Channa argus*) in China. *Letters in applied microbiology*, *69*(2), 100-109. https://doi.org/10.1111/lam.13172

Zheng, W., Cao, H., & Yang, X. (2012). *Aeromonas veronii* infection in the cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor). *African Journal of Microbiology Research*, *6*(44), 7218-7223.