

**NGHIÊN CỨU BƯỚC ĐẦU VỀ BỆNH ĐÓM TRẮNG NỘI TẠNG
Ở CÁ CHIM VÂY VÀNG (*Trachinotus blochii*) NUÔI Ở NHA TRANG**
*PRELIMINARY STUDY OF WHITE SPOT DISEASE IN INTERNAL ORGANS IN SNUB-
NOSE POMPAÑO (*Trachinotus blochii*)*

Nguyễn Thị Thùy Giang*, Dương Văn Quý Bình và Đỗ Thị Hòa
* Đại học Nha Trang - Email: nguyenthuygiang2007@gmail.com

ABSTRACT

In 2010, in cage-cultured snub-nose pompano (*Trachinotus blochii*) in Nha Trang Bay, a novel disease caused high mortalities at sizes 8-14cm. Small pimples which were developed to grey ulcerative spots on skin and tumors along the spine were found in diseased fish. Mucus, abscess and small white nodules appeared in the gill. Swollen kidney, spleen and liver with white nodules were observed. From 47 diseased fish, a Nocardia like bacterium was successfully isolated on Ogawa medium after 7-10 days in 26-28⁰C with white, dry and creasy colonies. The bacterium was about 2-10, branched, fragmented, Gram positive and acid fast. Histopathological observation presented lesions in kidney, spleen, liver, muscle and the spinal column. Development of tumors caused deformation of the spinal cells. *In vivo* challenge experiments and TEM proved that the Nocardia like bacterium was related to the internal organ white spot disease in snub-nose pompano. This was the first report in Viet Nam that Nocardia sp. was the pathogen in cultured marine fish.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá chim vây vàng (*Trachinotus blochii*) là loài cá biển đang được tiến hành sinh sản nhân tạo và ương nuôi ở Vũng Ngán, thành phố Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa. Năm 2010, bệnh đốm trắng nội tạng đã xuất hiện và gây chết nhiều cá có kích thước từ 8 -14cm, đang được nuôi trong các lồng bè trên biển. Cá bị bệnh đã thể hiện các dấu hiệu như: có các nốt phồng rộp nhỏ ở da, khi vỡ tạo nên các vết loét nhỏ màu xám, có các khối u làm dọc cột sống làm cơ thể cá cong vẹo, dị dạng, bụng cá hơi phình và cứng. Các u hạt màu trắng xám đã quan sát thấy ở trên và trong một số cơ quan của cá như: mang, gan, thận và lách. Các biến đổi bệnh lý trong tổ chức cơ quan của cá bệnh và tác nhân chính gây ra bệnh này đã được trình bày và mô tả trong báo cáo này

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu mẫu cá

47 cá chim vây vàng (kích thước từ 7-14cm) bị bệnh có biểu hiện: có các nốt phồng rộp nhỏ ở da, khi vỡ tạo nên các vết loét nhỏ màu xám, có các khối u làm dọc cột sống làm cơ thể cá cong vẹo, dị dạng, bụng cá hơi phình và cứng và 10 con cá không có dấu hiệu của bệnh, đã được thu trong các túi riêng biệt, có sục khí để đảm bảo các mẫu cá còn sống khi chuyển về phòng thí nghiệm.

Các phương pháp nghiên cứu đã được sử dụng

Phương pháp mô bệnh học

Để nghiên cứu những biến đổi bệnh lý trong mô và tế bào của các tổ chức ở cá bệnh, phương pháp mô bệnh ứng dụng cho nghiên cứu ở cá xương được giới thiệu bởi Tonguthai & CTV (1999) đã được sử dụng trong nghiên cứu này.

Phương pháp nghiên cứu bệnh do vi khuẩn

Phương pháp nghiên cứu bệnh do vi khuẩn ở cá của Whitman (2004) đã được dùng để phân lập, định dạng và xác định vai trò của vi khuẩn trong việc gây ra bệnh đốm trắng nội tạng ở cá chim vây vàng

Làm và nhuộm các tiêu bản phết mô từ nội tạng của cá bệnh và cá khỏe

Sát trùng bề mặt cơ thể cá bằng miếng bông thấm cồn etylic 70%, sau đó sử dụng kéo vô trùng để giải phẫu cá và tách các nội tạng như mang, não, gan, lách, và thận.

Dùng kéo và panh vô trùng để cắt và kẹp một miếng nhỏ mô từ các tổ chức có bộc lộ các u hạt màu trắng; phết mô cắt này trên mặt của tấm lam sạch chứa một giọt nước muối sinh lý vô trùng (0,85%) để tạo một vết bôi và để tiêu bản khô trong không khí. Các tiêu bản này được cố định trên đèn cồn trước khi đưa vào nhuộm.

Phương pháp nhuộm Gram

Các tiêu bản có chứa vết bôi từ mô cá bệnh được nhuộm bằng tím crystal và fuchsin, cố định bằng lugol và làm mất màu của tím crystal bằng dung dịch cồn-aceton. Cuối cùng, các tiêu bản này được rửa nước chảy nhẹ, để khô tự nhiên và quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 lần trong dầu để phát hiện sự tồn tại của vi khuẩn trong mô, quan sát hình dạng và màu sắc của vi khuẩn sau khi đã nhuộm Gram: vi khuẩn Gram (+) có màu tím và vi khuẩn Gram (-) có màu hồng.

Phương pháp nhuộm Ziehl- Neelsen

Phương pháp nhuộm Ziehl-Neelsen đã được sử dụng để nhận biết vi khuẩn kháng acid (acid fast) có mặt trong tổ chức mô của cá bệnh.

Các bước tiến hành như sau: dung dịch carbol fuchsin (0,03g fuchsin pha trong 10ml cồn etylic 95%, rồi bổ sung thêm 5g phenol và 95ml nước cất) đã được nhỏ tràn trên bề mặt của vết bôi trên tiêu bản phết mô và tiêu bản này được hơ nóng trên ngọn lửa đèn cồn để nước bốc hơi trong 10 phút. Tiếp theo, các tiêu bản này được rửa nhẹ nhàng với nước sạch trước khi làm mất màu bằng acid acetic 0,5% trong 20-30 giây. Sau đó, các tiêu bản phết được nhuộm bằng Methylene blue trong 60 giây, được rửa nhẹ bằng nước sạch và cuối cùng để khô.

Tiêu bản đã nhuộm Ziehl-Neelsen được quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000x trong dầu, cơ chất của tổ chức vật chủ bắt màu xanh lam nhạt của methylene blue, các khuẩn lạc hay các đám tế bào của vi khuẩn kháng acid bắt màu hồng tím của Fuchsin.

Phân lập vi khuẩn từ mô của cá bệnh

Chuẩn bị môi trường dùng cho phân lập vi khuẩn

Dựa vào kết quả quan sát các tiêu bản phết từ mô cá bệnh bằng kính hiển vi quang học để chọn các loại môi trường dùng cho phân lập.

Để phân lập vi khuẩn từ cá bệnh, hai môi trường giàu dinh dưỡng không chọn lọc như: TSA (Tryp Soy Agar) và NA (Nutrient Agar) được sử dụng. Đồng thời, sử dụng 2 môi trường có tính chọn lọc vi khuẩn cao là môi trường Ogawa được dùng để phân lập các vi khuẩn kháng acid và môi trường TCBS (Thiosulphate Citrate Bilesalt Sucrose) dùng để phân lập vi khuẩn Vibrio.

Các môi trường dinh dưỡng tổng hợp đã có bán sẵn trên thị trường được pha chế như hướng dẫn của nhà sản xuất ghi trên nhãn mác chai đựng môi trường. Riêng môi trường Ogawa đã được pha chế bằng phương pháp thủ công.

Môi trường Ogawa gồm 3 thành phần sau

Dung dịch muối khoáng: 3g Kali - dihydrophosphate (KH_2PO_4); 3g Sodium glutamate, 6g NaCl hòa tan trong 300ml nước cất. Dung dịch này được hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C, trong thời gian 30 phút.

Dung dịch malachite green, 2%: Hòa tan 2g bột Malachite green với 100ml nước cất tiệt trùng, đựng trong dụng cụ thủy tinh vô trùng rồi đặt vào trong tủ âm.

Trứng: Trứng gà mới đẻ (không quá 7 ngày từ khi đẻ) được làm sạch bên ngoài bằng xà phòng, rồi ngâm tiếp trong dung dịch xà phòng 30 phút, tiếp theo rửa nước sạch và ngâm

trong cồn etanol 70% 15 phút. Trứng đã làm sạch, được làm vỡ bằng một con dao vô trùng, rồi cho dịch trứng vào dụng cụ vô trùng, trộn đều trứng bằng một dụng cụ khuấy vô trùng.

Trộn đều 300 ml dung dịch muối khoáng, 18ml dung dịch malachite green 2%, 600 ml trứng gà và 18ml glycerol. Điều chỉnh pH của hỗn hợp này là 6,8, sau đó phân phối môi trường này vào mỗi ống nghiệm đã tiệt trùng (6-8 ml/ống). Để ống nghiệm nghiêng một góc 45⁰ (tạo mặt nghiêng) và làm đông môi trường trong các ống nghiệm này bằng cách đặt vào tủ sấy ở nhiệt độ 80°C – 85°C trong thời gian 45 phút. Khi môi trường đã rắn lại sẽ có màu xanh lá chuối non.

Phân lập vi khuẩn từ cá bệnh

Bệnh phẩm thu từ gan, thận, lách và mang của cá bệnh được cấy trên các đĩa lồng chứa môi trường phân lập như TSA (hoặc NA) và TCBS, và phần mặt nghiêng của môi trường trứng Ogawa trong các ống nghiệm. Các đĩa lồng sau khi cấy được ủ ở nhiệt độ 26 – 28°C. Quan sát sự xuất hiện của các khuẩn lạc trên đĩa và ống nuôi cấy 2 lần/ngày.

Các chủng thuần được tách ra từ các khuẩn lạc rời trên môi trường TSA, NA và TCBS sau khi được ủ ở nhiệt độ 28°C trong 24h. Trong khi đó, các chủng vi khuẩn tách ra từ môi trường Ogawwa sau khi đã được ủ ở nhiệt độ 28°C trong 7 - 10 ngày.

Khi các khuẩn lạc xuất hiện trong các ống nghiệm chứa chủng thuần, các tiêu bản ép tươi, nhuộm Gram và nhuộm Ziehl-Neelsen được thực hiện để kiểm tra hình dạng, cách sắp xếp và cách bắt màu của vi khuẩn.

Các phản ứng sinh hóa đã được sử dụng để xác định khả năng oxy hóa và lên men (OF), khả năng lên men đường lactose, glucose, khả năng sinh hơi và sinh H₂S (KIA), khả năng di động, phản ứng catalase, oxidase, nitrat và khả năng lên men các loại đường khác như: arabinose, sucrose, galactose, manose, maltose... Các kết quả này được sử dụng làm cơ sở cho việc định danh vi khuẩn theo hệ thống phân loại của Bergey được trình bày bởi Holt, J.G. & CS (1994).

Quan sát chủng vi khuẩn kháng acid từ cá bệnh bằng kính hiển vi điện tử

Để hỗ trợ cho việc định danh vi khuẩn là tác nhân gây bệnh, các mẫu mô thận và lách cá bệnh đã được cố định trong dung dịch Glutaraldehyde với tỷ lệ về thể tích là 1/10 (mẫu/dung dịch cố định), được giữ trong đá khô và được quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) ở Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương, Hà Nội.

Thí nghiệm cảm nhiễm trong điều kiện in vivo để xác định tác nhân gây bệnh

Sử dụng 2 chủng vi khuẩn đã phân lập được ở cá bệnh với tần xuất gặp cao (VKCVV01 và VKCVV02), các thí nghiệm cảm nhiễm vào cá khỏe đã được thực hiện ở trại thực nghiệm ở phường Vĩnh Hòa, Nha Trang

Các vật liệu dùng cho thí nghiệm

Chủng vi khuẩn nghi ngờ VKCVV01: là trực khuẩn ngắn (1-2 µm), tròn 2 đầu, Gr (-), phát triển nhạy rất mạnh xung quanh khuẩn lạc hình tròn trên môi trường TSA hoặc NA, khuẩn lạc có màu vàng trên TCBS và bắt gặp với tỷ lệ cao ở những con cá bị bệnh (30/47 con cá bệnh), đặc biệt khi bệnh phẩm lấy từ mang của cá bệnh.

Chủng vi khuẩn nghi ngờ VKCVV02: là trực khuẩn dài (2 – 10µm), phân nhánh, gãy đốt, Gr (+), là vi khuẩn kháng acid, phân lập được trên môi trường Ogawa và được tìm thấy ở 100% các tiêu bản (47/47 con cá bệnh) phết từ mô của nội tạng (lách, gan, thận, mang và cơ gần khối u cột sống), nhưng không tìm thấy hoặc phân lập được chủng vi khuẩn này ở các con cá khỏe (n=10 con) được sử dụng nghiên cứu.

Cá dùng cho thí nghiệm cảm nhiễm: Cá chim vây vàng (có chiều dài 8-10cm) được mua từ Trại Thực nghiệm của Khoa Nuôi trồng Thủy sản, Trường Đại học Nha Trang. Các con cá này hoàn toàn khỏe mạnh, không bộc lộ các dấu hiệu bệnh lý ở ngoài và trong cơ thể cá. Năm con cá đã được giải phẫu để kiểm tra bệnh lý và tìm vị trí an toàn nhất để tiêm huyền dịch vi

khuẩn vào ổ bụng của cá. Cá được đưa về cơ sở thực nghiệm 1 tuần trước khi thí nghiệm bắt đầu.

Tạo huyền dịch vi khuẩn dùng để tiêm cho cá: Lấy một số khuẩn lạc mọc trên mặt nghiêng của ống nghiệm chứa chủng thuần, đưa vào nước muối sinh lý (0,85% NaCl) vô trùng để tạo ra các huyền dịch có độ đục khác nhau. So độ đục này với các ống đục chuẩn của MacFaland để tạo ra các ống chứa huyền dịch với các mật độ vi khuẩn khác nhau theo mục đích của từng thí nghiệm. Giữ các ống chứa huyền dịch này ở nhiệt độ 4⁰C cho đến khi sử dụng để tiêm cho cá khỏe. Ngoài ra, mật độ của các huyền dịch này cũng đã được kiểm tra lại bằng phương pháp gián tiếp, pha loãng và nuôi cấy trên các đĩa thạch.

Thí nghiệm cảm nhiễm vi khuẩn nghi ngờ vào cá khỏe

Thí nghiệm 1: Hai chủng VKCVV01 và VKCVV02 với mật độ 10⁶ cfu/ml, được cảm nhiễm riêng rẽ vào cá khỏe bằng cách tiêm vào xoang bụng của cá với liều 0,1 ml/con; cá ở nghiệm thức đối chứng được tiêm nước muối sinh lý vô trùng (0,1ml/con). Thí nghiệm được thực hiện trong các thùng nhựa 120 lít (10 con cá/thùng), lặp lại đồng thời 2 lần, sục khí liên tục, thay nước đồng loạt 30% khi thấy nước đục. Sức khỏe của cá, các dấu hiệu bệnh lý, tỷ lệ cá chết và một số yếu tố môi trường như nhiệt độ, pH và độ mặn đã được theo dõi hàng ngày. Những con cá bị bệnh và hấp hối được thu để kiểm tra bệnh lý, làm các tiêu bản mô bệnh học, phết nội tạng và phân lập vi khuẩn như đã trình bày ở mục trước.

Thí nghiệm 2: Thí nghiệm 1 đã xác định được chủng vi khuẩn VKCVV02 là tác nhân gây ra bệnh đốm trắng nội tạng ở cá chim vây vàng. Do đó, để khẳng định VKCVV02 là tác nhân gây bệnh ở cá chim vây vàng theo nguyên tắc của Korch và xác định tính độc của chủng vi khuẩn này thông qua chỉ số LD50%, thí nghiệm cảm nhiễm thứ 2 đã được thực hiện. Theo đó, 0,1ml huyền dịch của chủng VKCVV02 đã được tiêm vào cá khỏe với các mật độ khác nhau: 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ và 10⁸ tb/ml (xác định mật độ bằng phương pháp MacFaland). Tuy nhiên, sau khi kiểm tra lại bằng phương pháp nuôi cấy trên đĩa thạch, mật độ của các huyền dịch ở các nghiệm thức đã được xác định lại lần lượt là: NT1: 0,98 x 10⁴; NT2: 1,02 x 10⁵; NT3: 1,10 x 10⁶; NT4: 0,85 x 10⁷ và NT5: 0,97 x 10⁸ cfu/ml. Ở nghiệm thức đối chứng (ĐC), 0,1 ml nước muối sinh lý vô trùng đã được tiêm vào xoang bụng của mỗi con cá. Phương pháp tiêm huyền dịch vi khuẩn vào cá, chăm sóc, theo dõi, thu mẫu và phân tích các mẫu cá bệnh trong thí nghiệm này cũng được thực hiện tương tự như đã trình bày ở thí nghiệm 1. Thí nghiệm này đã được lặp lại cùng lúc 02 lần. Chỉ số LD50 đã được xác định theo công thức của Reed và Muench (1938): $LD50 = a^{x-pd}$, trong đó: x là nồng độ vi khuẩn thấp nhất gây chết cá 50%; a là bậc pha loãng của các liều vi khuẩn (trong thí nghiệm này a=10); pd (*hiệu số hiệu chỉnh*) = $[L (\text{tỷ lệ \% cá chết thấp nhất} > 50\%) - 50] / [L (\text{tỷ lệ \% cá chết thấp nhất} > 50\%) - H (\text{tỷ lệ \% cá chết cao nhất} < 50\%)]$

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

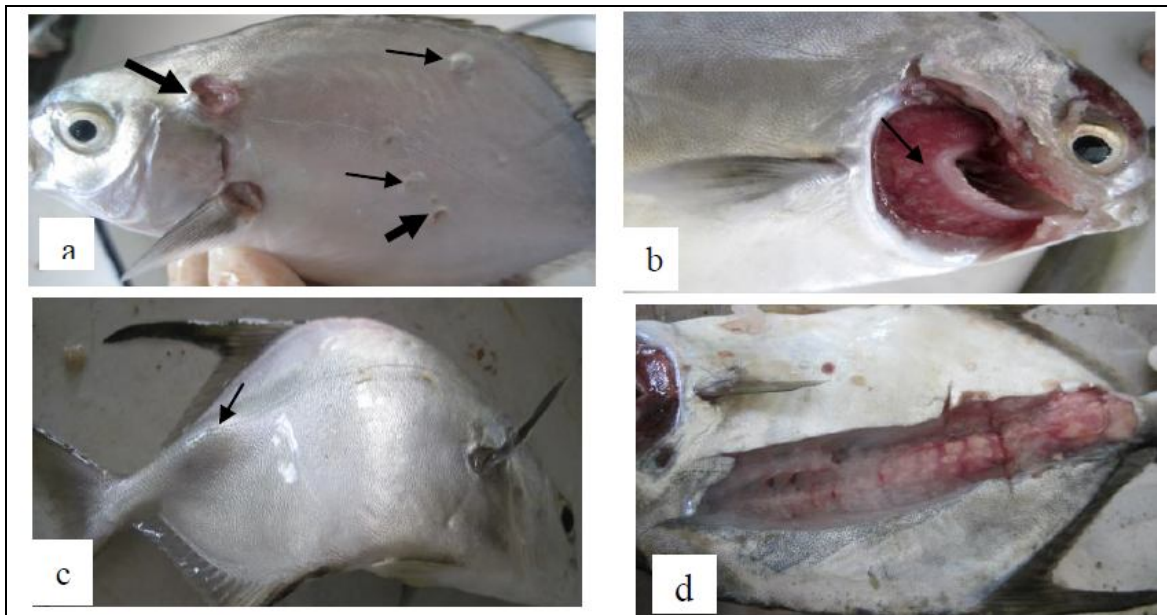
Các dấu hiệu chính của bệnh đã quan sát được

Quan sát bên ngoài cơ thể và bên trong ổ bụng của cá bệnh đã phát hiện được nhiều dấu hiệu đặc trưng cho bệnh này ở cá chim vây vàng. Trên bề mặt cơ thể cá bệnh xuất hiện nhiều nốt phỏng rộp nhỏ dưới da, khi các nốt phỏng này vỡ ra và tạo nên các thương tổn màu xám, nhỏ (hình 1a). Mang cá bệnh tiết rất nhiều dịch nhầy, làm các tơ mang dính bết vào nhau, một vài thương tổn hoại tử đã quan sát thấy trên mang của một số con cá bệnh (hình 1b). Dọc theo cột sống của một số con bị bệnh có 1 hay nhiều khối u nằm dọc cột sống, khi khối u có kích thước lớn đã làm cơ thể cong gập, dị dạng (hình 1c & d). Khi giải phẫu những con cá bệnh, các đốm trắng nhỏ đã được quan sát thấy trên và trong một số nội tạng như thận, gan và lách. (hình 2).

Các biến đổi bệnh lý trong mô và tế bào của cá bệnh

Sự thoái hóa từ nhẹ đến nặng kết hợp với các thương tổn dạng u hạt thay thế cho các mô mềm đã quan sát được trong các tổ chức nội tạng như gan, thận, lách và cơ của cá bệnh và làm biến dạng cấu trúc mô ở các tổ chức này.

Các vật chất hữu cơ bị hoại tử nằm ở vùng trung tâm của các u hạt và xung quanh u hạt này được bao bọc bởi một vách dày được tạo ra do các lớp tế bào biểu mô chết. Khi quan sát ở độ phóng đại > 400 lần, vi khuẩn dạng hình que cũng đã được phát hiện ở vùng trung tâm của khối u và các đại thực bào đã quan sát thấy tập trung xung quanh các u hạt (hình 3 và 4). Riêng ở các u xương dọc cột sống, các thương tổn dạng u hạt có kích thước lớn hơn so với các u hạt ở các mô mềm như thận, lách, gan và cơ và gây tác động chèn ép làm biến dạng, méo mó các tế bào xương và tạo nên khối u xương ở dọc cột sống (hình 5).

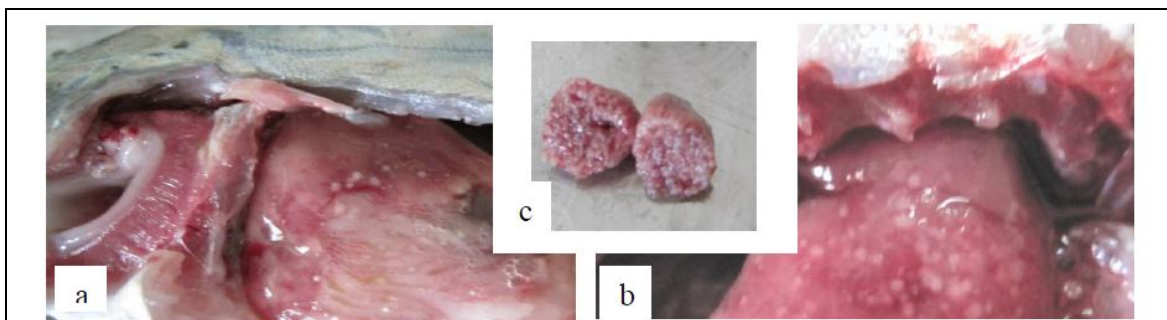


Hình 1: Các dấu hiệu bên ngoài của cá chim vây vàng bị bệnh đốm trắng nội tạng

a. Các nốt phồng rộp ở da (mũi tên nhỏ) và các vết loét nhỏ màu xám (mũi tên lớn)

b. Mang cá bệnh bị tiết nhiều dịch nhầy và có các u hạt trắng (mũi tên đen)

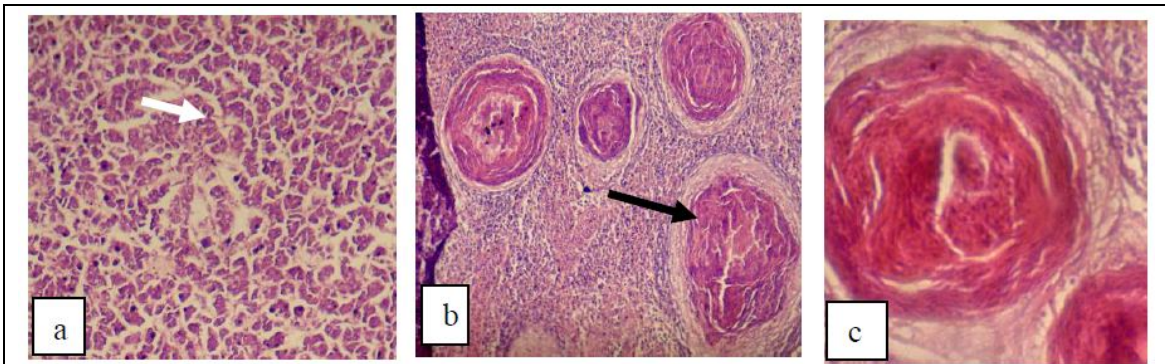
c & d. Khối u (mũi tên) nằm ở cột sống làm cá bệnh cong vẹo, dị dạng



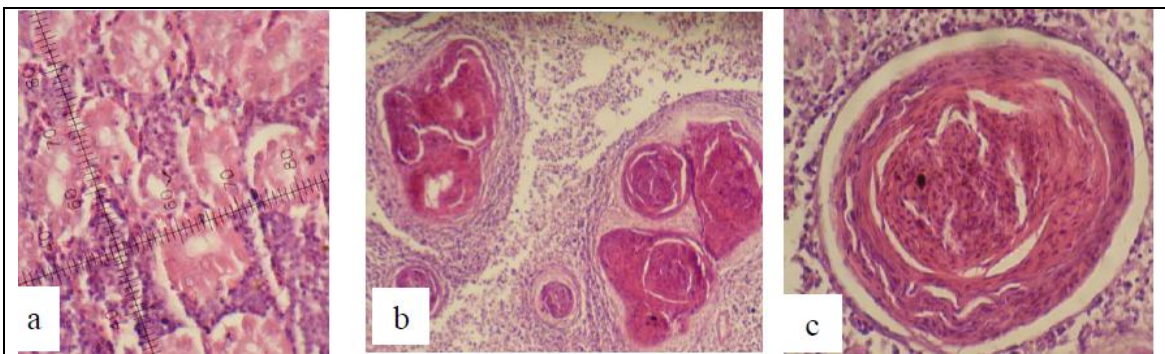
Hình 2. Các dấu hiệu thể hiện trong nội tạng của cá chim vây vàng bị bệnh

a & b. Nhiều u hạt nhỏ, màu trắng xuất hiện ở gan của cá bệnh.

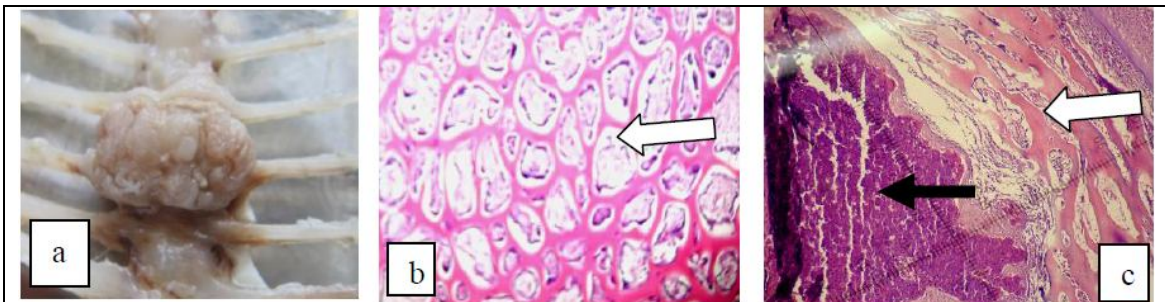
c. Nhiều u hạt màu trắng, nhỏ đã xuất hiện ở lách cá bệnh, làm tổ chức này sưng to hơn bình thường



Hình 3: Biến đổi bệnh lý ở lách của cá chim vây vàng bị bệnh đốm trắng nội tạng
 a. Mô học của lách ở cá khỏe (nhuộm với H&E, độ phóng đại 400x)
 b. Nhiều thương tổn dạng u hạt tồn tại trong tổ chức lách của cá bệnh (nhuộm với H&E, 100x)
 c. Các thương tổn dạng u hạt tồn tại nhiều trong tổ chức lách của cá bệnh (nhuộm với H&E, 400x)

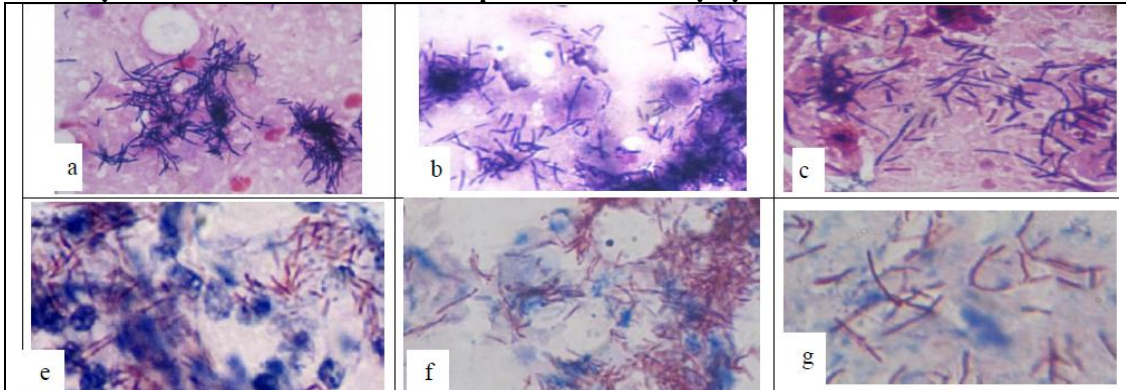


Hình 4: Biến đổi bệnh lý ở thận cá chim vây vàng bị bệnh đốm trắng nội tạng
 a. Mô thận của cá chim vây vàng khỏe (nhuộm với H&E, 400x)
 b. Mô thận của cá bệnh với rất nhiều các vùng thương tổn dạng u hạt (nhuộm với H&E, 100x)
 c. Các thương tổn dạng u hạt đặc thù gặp ở mô thận với sự tập trung của các đại thực bào xung quanh u hạt và các vi khuẩn dạng que ở trung tâm (nhuộm với H&E, 400x)



Hình 5: Biến đổi bệnh lý ở xương sống cá bệnh, nơi xuất hiện các khối u (với H&E)
 a. Khối u trên xương sống cá chim vây vàng bị bệnh (lược chín, gỡ thịt)
 b. Mô của xương sống cá khỏe (400x),
 c. Thương tổn dạng u hạt bất màu tím của thuốc nhuộm hematoxylin chiếm chỗ trong mô xương, chèn ép, dồn nén làm biến dạng các tế bào xương (Mũi tên màu đen chỉ khối u hạt, mũi tên màu trắng chỉ mô xương) (400x)

Phát hiện vi khuẩn trên các tiêu bản phết mô của cá bị bệnh

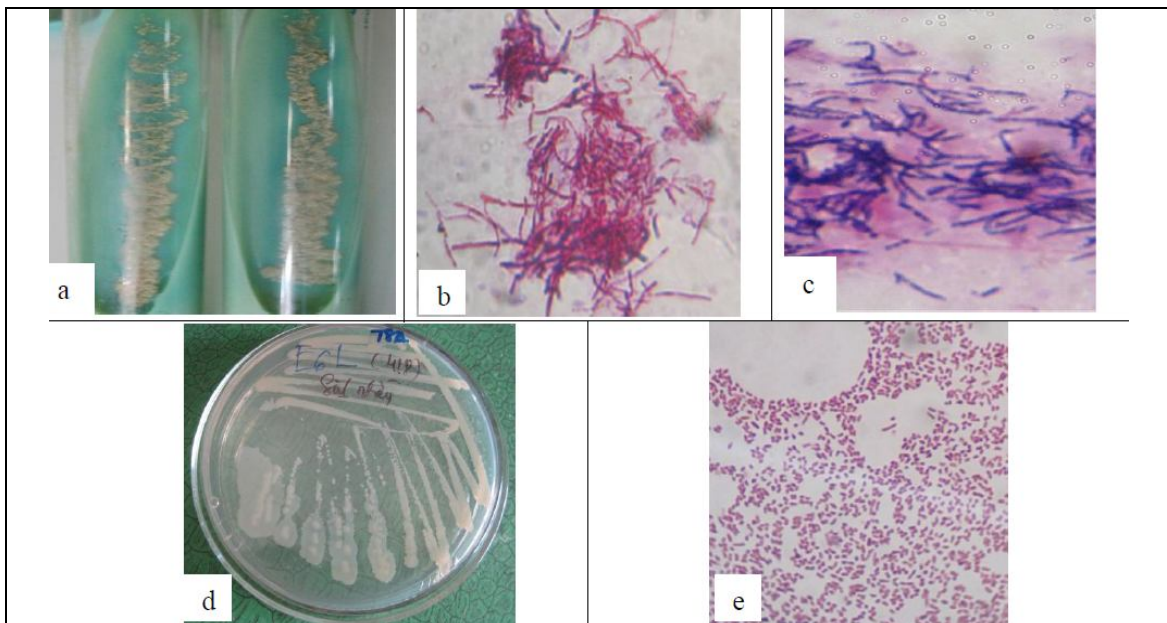


Hình 6. Trục khuẩn mảnh, phân nhánh, có gãy thành đốt, Gram (+) và kháng acid (có màu hồng của Fuchsin khi nhuộm Ziehl-Neelsen và có màu tím xanh khi nhuộm Gram) đã được phát hiện trên các tiêu bản phết mô từ cá bị bệnh.

- a, b, c: các tiêu bản phết mô của não, cơ ở bề mặt khối u, lách và thận của cá bệnh nhuộm Gram
 - e, f, g: các tiêu bản phết mô như đã trình bày ở trên nhưng được nhuộm Ziehl-Neelsen, mô có màu xanh của methylen blue, các tế bào vi khuẩn có màu hồng của fuchsin

Các tiêu bản phết đã được làm từ mô của mang, cơ dưới vùng da bị phỏng rộp, gan, thận, lách và não của cá chim vây vàng bị bệnh đốm trắng nội tạng, được nhuộm bằng 2 phương pháp: Gram và Ziehl-Neelsen. Dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 lần, một loại vi khuẩn dạng que, phân nhánh, một số nhánh gãy thành các đoạn ngắn, dài từ 2- 10µm, Gram (+) và kháng acid đã được phát hiện rất phổ biến ở hầu hết các tiêu bản phết mô gan thận, lách... từ cá bị bệnh. Tuy nhiên hoàn toàn không phát hiện được loài vi khuẩn này trong các tiêu bản phết mô làm từ cá khỏe. Kết quả quan sát này thể hiện rằng, cá chim vây vàng bị đốm trắng nội tạng đã bị nhiễm vi khuẩn hệ thống (nhiễm toàn thân). Ngoài loài vi khuẩn như đã mô tả ở trên, ở một số tiêu bản phết cũng phát hiện một số trục khuẩn Gram (-), ngắn 1-2 µm nhiễm ở mô mang và nội tạng của 1 số cá bệnh (hình 6).

Kết quả phân lập vi khuẩn từ cá bệnh



Hình 7. Kết quả phân lập vi khuẩn từ cá bị bệnh

- VKCVV02: Khuẩn lạc (a), tế bào nhuộm Ziehl-Neelsen (b) và nhuộm Gram (c) của chủng vi khuẩn đã phân lập được trên môi trường Ogawa.
 - VKCVV01: Khuẩn lạc (d) và tế bào nhuộm Gram (e) của chủng vi khuẩn sinh nhầy phân lập được trên TSA, NA và TCBS từ cá bệnh.

Bệnh phẩm lấy từ mang, gan, thận và lách của cá bệnh đã được nuôi cấy phân lập trên các môi trường dinh dưỡng: TSA hoặc NA (2% NaCl), môi trường Ogawa (2% NaCl) và TCBS. Sau 24h ủ mẫu ở nhiệt độ 28⁰C, đã xuất hiện nhiều khuẩn lạc tròn, trắng và sinh nhầy mọc trên môi trường TSA hoặc NA; khuẩn lạc tròn, lồi, có màu vàng trên TCBS. Kiểm tra trên các tiêu bản ép nhuộm Gram đã phát hiện các trực khuẩn ngắn, kích thước từ 1-2 μm, Gram (-), các vi khuẩn này không bắt màu hồng khi nhuộm Ziehl-Neelsen và đã được ký hiệu là VKCVV01 (hình 7 d & e).

Trên mặt nghiêng các ống nghiệm chứa môi trường Ogawa, các khuẩn lạc màu trắng như phấn, khô và nhăn nheo trên bề mặt đã mọc khá dày sau 7 -10 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 26-28⁰C. Từ các khuẩn lạc này, các tiêu bản nhuộm Gram và nhuộm Ziehl-Neelsen đã được thực hiện. Dưới kính hiển vi quang học (phóng đại 400-1000 lần) đã xác định được một loại trực khuẩn dài 2- 10μm, phân nhánh, một số nhánh bị gãy để tạo nên các đoạn ngắn, Gram (+) và kháng acid và được phát hiện phổ biến trong các mô nội tạng của cá bệnh. Loại vi khuẩn này hoàn toàn không phát triển trên các môi trường dinh dưỡng NA, TSA hoặc TCBS. Điều đó chứng tỏ rằng chúng đã được phân lập thành công trên môi trường Ogawa. Chúng vi khuẩn này hoàn toàn không phân lập được từ các mẫu cá khỏe và được ký hiệu là VKCVV02 (hình 7 a,b và c).

Bằng phương pháp vi sinh vật học truyền thống, dựa vào các đặc điểm hình dạng, cấu tạo và sinh hóa, chủng vi khuẩn VKCVV01 đã được xác định là loài *Vibrio alginolyticus*, loài này đã được thông báo là tác nhân gây bệnh ở tôm và cá biển (Liu, C.H. & CS, 2004).

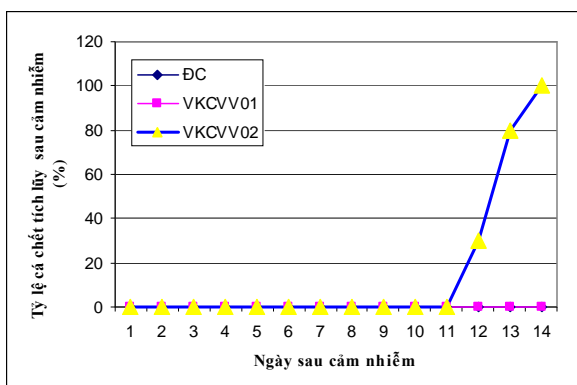
Chủng vi khuẩn VKCVV02 đã thể hiện một số đặc điểm của giống vi khuẩn *Nocardia*, thuộc nhóm 22, *Nocadioform Actinomycetes*, trong hệ thống phân loại của Bergey như: trực khuẩn dài, mảnh, phân nhánh, một số nhánh tồn tại tự do trong không khí bị gãy thành nhiều đoạn, Gram dương, kháng acid; khuẩn lạc màu trắng như phấn, khô, nhăn nheo trên bề mặt, mọc khá chậm trên môi trường đặc thù Ogawa (có 2% NaCl), khoảng từ ngày nuôi cấy thứ 6 -7 ở nhiệt độ 26-28⁰C mới phát hiện được rõ các khuẩn lạc (hình 7a là khuẩn lạc quan sát ở ngày nuôi cấy thứ 10). Một số đặc điểm sinh hóa của chủng VKCVV02 đã được xác định như: Catalase (+), Cytochrom oxydase (-), O/F (-/-), sinh hơi (-), sinh H₂S (-), không di động, Nitrate (+) và ngoài khả năng lên men glucose (+) còn lại âm tính (-) với hàng loạt các loại đường khác như: Lactose, Mannitol, Maltose, Mannose và Galactose. Với các đặc điểm về hình thái và sinh hóa như đã nêu ở trên, chủng VKCV02 được cho là tương tự như loài *Nocardia* sp., viết tắt là NLB (Nocardia Like Bacteria).

Cảm nhiễm các chủng vi khuẩn đã phân lập được vào cá khỏe

Cảm nhiễm VKCVV01 (Vibrio alginolyticus) và VKCVV02 (NLB) vào cá khỏe

0,1 ml huyền dịch có mật độ 10⁶ tế bào/ml của mỗi chủng vi khuẩn nói trên đã được tiêm vào ổ bụng, ở vị trí trước vây bụng của cá khỏe (cỡ 8-10cm); cá ở nghiệm thức đối chứng được tiêm 0,1 ml nước muối sinh lý (0,85%). Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện nhiệt độ 28-29⁰C, pH 7,8-8,0, độ mặn 30‰. Bố trí thí nghiệm đã được trình bày ở phần phương pháp nghiên cứu và kết quả thể hiện ở hình 8.

Sau 14 ngày thí nghiệm, hiện tượng cá chết đã không xảy ra ở nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức tiêm *V. alginolyticus*. Tuy nhiên, hiện tượng cá chết với các dấu hiệu bệnh đặc thù của bệnh đốm trắng nội tạng đã được quan sát thấy ở nghiệm thức tiêm VKCVV02 (NLB), bắt đầu vào ngày thứ 11 và chết 100% vào ngày thứ 14. **Kết quả thí nghiệm này đã xác định được chủng VKCVV02 (NLB) là tác nhân chính gây ra bệnh đốm trắng nội tạng ở cá chim vây vàng**



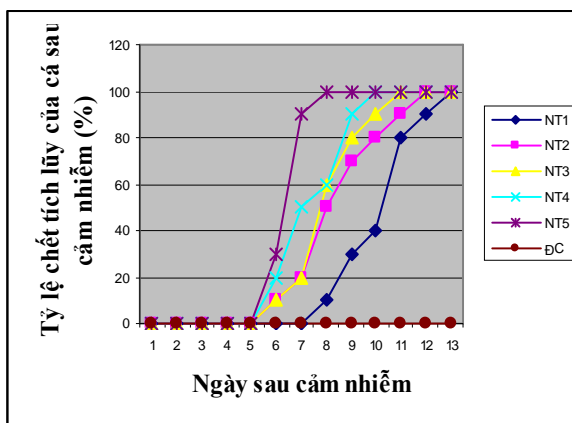
Hình 8. Tỷ lệ chết tích lũy (%) của cá trong thí nghiệm cảm nhiễm 1
 - VKCVV01: *Vibrio alginolyticus*
 - VKCVV02: Nocardia Like Bacteria (NLB)

Cảm nhiễm VKCVV02 với các liều khác nhau vào cá khỏe

Ở thí nghiệm thứ 2, vi khuẩn NLB đã được cảm nhiễm vào cá chim vây vàng khỏe với các liều khác nhau: 0,1ml huyền dịch của vi khuẩn NLB ở mật độ khác nhau (NT1: 10^4 ; NT2: 10^5 ; NT3: 10^6 ; NT4: 10^7 và NT5: 10^8 tế bào/ ml) đã được tiêm vào ổ bụng của mỗi con cá khỏe, 0,1ml nước muối sinh lý vô trùng được tiêm cho mỗi con cá ở nghiệm thức đối chứng (ĐC) theo phương pháp đã được trình bày ở phần phương pháp nghiên cứu. Thí nghiệm đã được thực hiện trong điều kiện: 24-26°C, pH: 7,4-7.8 và độ mặn: 28- 30 ppt.

Kết quả ở hình 9 đã thể hiện, khi cá bị cảm nhiễm vi khuẩn NLB với liều càng cao thì cá bị chết càng sớm và đạt tỷ lệ chết 100% nhanh hơn. Cá ở các nghiệm thức NT2, NT3, NT4 và NT5 bắt đầu chết vào ngày thứ 5 sau cảm nhiễm và chết 100% theo thứ tự vào các ngày thứ 12, 11, 10 và 8. Cá ở NT1, chỉ bắt đầu chết vào ngày thứ 7 và chết 100% vào ngày thứ 13. Chỉ số gây chết 50% LD50 của vi khuẩn này đã được xác định sau 8 ngày cảm nhiễm là: $1,78 \times 10^4$.

Cá chim vây vàng bị bệnh sau cảm nhiễm ở thí nghiệm 2 đã bộc lộ rõ một số các dấu hiệu đặc thù của bệnh đốm trắng nội tạng như đã trình bày ở trên (hình 1).



Hình 9. Tỷ lệ chết tích lũy (%) của cá bị cảm nhiễm chủng NLB ở các liều lượng vi khuẩn VKCVV02 khác nhau

Thảo luận

Với các dấu hiệu chính của bệnh đốm trắng nội tạng ở cá chim vây vàng (hình 1&2), các biến đổi bệnh lý trong mô và tế bào của các tổ chức cơ quan ở cá bệnh (hình 3,4 & 5) và việc phát hiện một số lượng lớn vi khuẩn dạng hình que, Gram (+), kháng acid, phân nhánh và gây đốt

trong các tiêu bản phết mô của cá bệnh (hình 6) đã chứng tỏ rằng: các mẫu cá bệnh đã bị một bệnh nhiễm trùng hệ thống và các thương tổn nặng nề ở mô của các nội tạng như gan, thận và lách là nguyên nhân gây chết cho cá bệnh.

Đã có nhiều công trình được công bố bởi các tác giả trong và ngoài nước về các loại bệnh khác nhau ở cá xương có chung dấu hiệu bệnh lý là các u hạt trắng xuất hiện ở trên hay trong nội tạng của cá bệnh cũng như các thương tổn dạng u hạt thể hiện trên các tiêu bản mô bệnh học. Ví dụ như bệnh mũ ở gan thận của cá tra nuôi ở đồng bằng sông Cửu Long do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (Crumlish M. & CS, 2002; Nguyễn Quốc Thịnh & CS, 2004). Bệnh Photobacteriosis do vi khuẩn *Photobacterium damsela* gây ra ở cá cobia nuôi ở Đài Loan với các đốm trắng dạng hạt nằm trong thận, lách hay gan của cá bệnh (Liu & CS, 2003). Bệnh Nocardiosis do nhiễm vi khuẩn *Nocardia* spp. có dạng hình que, phân nhánh, Gram dương, kháng acid, đã được thông báo gây bệnh ở loài cá chim vây vàng (*Trachinotus blochii*) và nhiều loài cá biển khác như cá hồng (*Lutjanus* spp.), cá rô phi (*Oreochromis* sp.), cá mú (*Epinephelus* spp) ở Malaysia, Trung Quốc và Singapore (Labrie & CS, 2008), cá *Lateolabrax japonicus* ở Đài Loan (Chen & CS, 2000; Shimahara & CS, 2009), cá đuôi vàng (*Seriola quinqueradiata*) nuôi ở Nhật bản (Kudo & CS, 1988; Itano & CS, 2002; Shimahara & CS, 2005), cá *Larimichthys crocea* (Wang & CS, 2005) và cá lóc (*Ophiocephalus argus*) (Wang & CS, 2007). Ngoài ra, biến đổi mô bệnh học ở các tổ chức nội tạng của cá bệnh có dạng u hạt cũng được phát hiện ở nhiều loài cá nuôi bị nhiễm bệnh Mycobacteriosis do vi khuẩn *Mycobacterium* spp., đây cũng là một vi khuẩn Gram (+) và kháng acid.

Một số đặc điểm về hình thái, sinh vật và hóa học của vi khuẩn VKCVV02 thể hiện sự tương đồng với các loài thuộc giống *Nocardia* spp. Do vậy, chủng VKCVV02 đã được định danh là một loài tương tự như *Nocardia*, viết tắt là NLB. Tuy nhiên, để phân loại chính xác hơn cần phải làm thêm một số đặc điểm sinh hóa khác như xác định hàm lượng của acid mycolic, phản ứng hypoxanthine, phản ứng testosterone và kháng Lysozyme...

Mặc dù cần tiến hành những nghiên cứu sâu hơn để xác định đến loài của vi khuẩn gây bệnh đốm trắng nội tạng ở cá chim vây vàng nuôi tại Khánh Hòa, nhưng kết quả thu được từ hai thí nghiệm cảm nhiễm ngược đã chứng minh được rằng, loại vi khuẩn tương tự như *Nocardia* (NLB) là tác nhân chính gây bệnh đốm trắng nội tạng ở cá chim vây vàng.

Đây là nghiên cứu bước đầu về một bệnh mới đã xảy ra ở một đối tượng cá nuôi mới được nhập vào Việt Nam trong vài năm gần đây và là báo cáo đầu tiên đã phân lập được loại vi khuẩn tương tự như *Nocardia* từ cá biển nuôi bị bệnh ở Việt Nam.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT Ý KIẾN

Kết luận

Cá Chim vây vàng (*Trachinotus blochii*), cỡ 6-14 cm bị bệnh đốm trắng nội tạng đã bộc lộ các dấu hiệu chính như sau: xuất hiện nhiều nốt phồng rộp ở da, các u hạt màu trắng, nhỏ ở mang và ở các nội tạng như lách, thận, gan và các khối u lớn hoặc nhỏ nằm dọc cột sống. Các thương tổn này đã làm cơ thể cá bệnh biến dạng và gây chết chết rải rác; tỷ lệ chết tích lũy quan sát được có thể đạt từ 30-70% cá nuôi.

Cá chim vây vàng bị bệnh đốm trắng nội tạng đã bị cảm nhiễm hệ thống trong các cơ quan nội tạng một dạng vi khuẩn hình que, dài từ 2-10 μ m, phân nhánh và thường gầy thành các đoạn ngắn, Gram (+) và kháng acid. Các đặc điểm hình thái, sinh vật và hóa học của chủng vi khuẩn này tựa như giống vi khuẩn *Nocardia* spp, do vậy được đặt tên là NLB (*Nocardia* Like Bacteria).

Kết quả cảm nhiễm ngược trong điều kiện thí nghiệm đã chứng tỏ rằng, vi khuẩn NLB là tác nhân gây ra bệnh đốm trắng nội tạng ở cá chim vây vàng nuôi lồng ở Khánh Hòa.

Đề xuất ý kiến

Cần tiến hành định danh đến loài chủng vi khuẩn NLB bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Quốc Thịnh, Từ Thanh Dung và Ferguson, H.W. (2004). Nghiên cứu mô bệnh học cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) bị bệnh trắng gan Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ 2004: 120-125.
- Chen, S-C., Lee, J.-L., Lai, C.-C., Gu, Y.-W., Gu, C.-T., Wang, C.-T., Chang, H-Y and K.-H. Tsai (2000). Nocardiosis in sea bass-*Lateolabrax japonicus* in Taiwan. J. Fish. Dis. 20: 299-307.
- Crumlish, M., Dung, T.T., Turnbull, J.F., Ngoc and Ferguson, H. (2002). Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage) cultured in Mekong delta, Vietnam. J. Fish. Dis. 25: 733 – 736.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ninth Edition. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland 21202, USA. 605-649p.
- Kudo, T., Hatai, K. and A. Seino (1988). A *Nocardia seriolae* sp. nov. causing nocardiosis of cultured fish. International Journal of Systematic Bacteriology 38, p.173–178.
- Liu, P.C., J. Y. Lin and K. K. Lee (2003). Virulence of *Photobacterium damsela* Subsp. Piscicida in Cultured cobia *Rachycentron canadum*. In Basic Microbiol. 42 (2003) 6, 499-507.
- Liu, C.H., Cheng, W., Hsu, J.P. and J.C. Chen (2004). *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp- *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction-PCR and 16s rDNA sequency. Dis Aquat Org, vol. 61, p.169-174.
- Labrie, L., J. NG., Z. Tan, C. Komar, E. Ho and L. Grisez (2008). Nocardial infections in fish: an emerging problem in both freshwater and marine aquaculture systems in Asia. Diseases in Asian Aquaculture VI, 297-312.
- Shimahara, Y., Y-F. Huang, M.-A. Tsai, P.-C. Wang, T. Yoshida, J - L. Lee and S. C. Chen (2009). Genotypic and phenotypic analysis of fish pathogen *Nocardia seriola* isolated in Taiwan. Aquaculture 294: 165-171.
- Shimahara, Y., Yasuda, H., Nakamura, A. and T. Itami (2005). Detection of antibody responses against *Nocardia seriolae* by enzyme-linked immunosorbent assay and a preliminary vaccine trial in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Bulletin of The European Association of Fish Pathologists, 25, p.270-275.
- Tonguthai K., S. Chinabut, T. Somsiri., P. Chanratchakool and S. Kanchanakhon (1999): Diagnostic procedures for finfish diseases. Aquatic Animal Health Research Institute.
- Wang, G.L., Xu, Y.J., Jin S. J.L. and S. P. Zhu (2007). Nocardiosis in snakehead, *Ophiocephalus argus* Cantor. Aquaculture, 271, p. 54–60.
- Wang, G.L., Yuan, S.P. and S. Jin (2005). Nocardiosis in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson). Journal of Fish Diseases, 28, p. 339–345.
- Whitman K.A and N.G. MacNair (2004). Finfish and Shellfish Bacteriology Manual Techniques and Procedures. Iowa State Press, 258p.