

ĐẶC ĐIỂM MÔ BỆNH HỌC CÁ RÔ (*ANABAS TESTUDINEUS*) NHIỄM VI KHUẨN *AEROMONAS HYDROPHILA* VÀ *STREPTOCOCCUS* SP. TRONG ĐIỀU KIỆN THỰC NGHIỆM

Đặng Thụy Mai Thy¹, Trần Thị Thủy Cúc¹, Nguyễn Châu Phương Lam¹,
Nguyễn Đức Hiền² và Đặng Thị Hoàng Oanh¹

ABSTRACT

Challenge experiment by injection of Aeromonas hydrophila strain A11-02 with 2,75x10⁷ CFU/ml and Streptococcus sp. strain S11-01 with 2,87x10⁷ CFU/ml and combination of two bacteria with 10⁵-10⁷CFU/ml was carried out with climbing perch (Anabas testudineus). Samples were collected at day 1, 2, 3, 4, 5, and 14 post-injection for histopathological analysis. Mortality rates in the treatments of single bacteria was 25% and 45%; and those in the treatments of complex bacteria were 70%, 80% and 90% with dose from 10⁵-10⁷CFU/ml, respectively. Microscopic observation of fresh smear of liver, kidney and spleen from diseased specimens reviewed both gram positive cocci and gram negative rod shaped. The tissues of spleen, kidney and liver started to change at 2 days post-injection and increased necrosis after 3, 4 and 5 days in the treatments of two bacteria. The congestion and haemorrhage were observed in the tissues of fishes infected with single bacteria.

Keywords: *Climbing perch, Aeromonas hydrophila, Streptococcus sp., histopathology*

Title: *Histopathology of Climbing perch (Anabas testudineus) infected with Aeromonas hydrophila and Streptococcus sp.*

TÓM TẮT

Thí nghiệm cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm chủng vi khuẩn Aeromonas hydrophila A11-02 với mật độ 2,75x10⁷ CFU/ml, chủng Streptococcus sp. S11-01 với mật độ 2,87x10⁷ CFU/ml và 3 nghiệm thức tiêm kết hợp 2 chủng vi khuẩn mật độ 10⁵-10⁷ CFU/ml và nghiệm thức đối chứng tiêm nước muối sinh lý. Mẫu được thu vào ngày thứ 1, 2, 3, 4, 5 và 14 sau gây cảm nhiễm. Kết quả tỉ lệ chết ở nghiệm thức tiêm đơn 25% và 45%, nghiệm thức tiêm kết hợp lần lượt là 70%, 80% và 90% ở mật độ 10⁵-10⁷CFU/ml. Kết quả quan sát phết kính mẫu tươi mô gan, thận và tỳ tạng phát hiện cầu khuẩn, gram dương và trực khuẩn, gram âm. Mô tỳ tạng, thận và gan ở cá cảm nhiễm vi khuẩn kết hợp mật độ từ 10⁵-10⁷CFU/ml thay đổi vào ngày thứ 2 và hoại tử ở ngày thứ 3,4 và 5. Hiện tượng xung huyết, xuất huyết quan sát thấy ở cá tiêm một chủng vi khuẩn.

Từ khoá: *Cá rô, Aeromonas hydrophila, Streptococcus, mô bệnh học*

1 GIỚI THIỆU

Cá rô (*Anabas testudineus*) là một trong những đối tượng thủy sản được nuôi phổ biến trong những năm gần đây do có chất lượng thịt ngon và hiệu quả kinh tế cao. Sự xuất hiện của cá rô “đầu vuông” có đặc điểm tăng trưởng nhanh và cho năng suất cao làm cho nghề nuôi cá rô càng phát triển nhanh ở một số tỉnh như Hậu Giang, An Giang, Cần Thơ, Đồng Nai, ... Hầu hết người nuôi thả cá với mật độ cao

¹Bộ môn Sinh học và Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

²Chi cục Thú Y Cần Thơ

và sử dụng thức ăn công nghiệp nên đã làm cho môi trường ngày càng ô nhiễm từ đó dịch bệnh phát sinh gây thiệt hại lớn.

Hiện nay, bệnh ở cá rô như bệnh nấm nhớt, đen thân nhất là bệnh xuất huyết do vi khuẩn gây ra đã gây nhiều thiệt hại cho các mô hình nuôi cá rô thâm canh. Bệnh do vi khuẩn xuất hiện quanh năm. Tuy nhiên, vào các tháng giao mùa tỉ lệ chết cao gây thiệt hại nghiêm trọng. Trong số các vi khuẩn gây bệnh xuất huyết ở cá thì *Aeromonas hydrophila* là vi khuẩn đã được công bố nhiều nhất có khả năng gây bệnh trên nhiều loài cá nước ngọt trên khắp thế giới với dấu hiệu bệnh lý ở cá nhiễm vi khuẩn gồm nhiễm trùng máu, xuất huyết, lở loét (Austin và Adams, 1996). Bên cạnh đó, vi khuẩn *Streptococcus* sp. cũng gây các triệu chứng tương tự cũng được phát hiện trên cá (Evans *et al.*, 2006). Nếu chỉ dựa vào những hình thái tổn thương bên ngoài mà không có các dữ liệu khác về bệnh lý của cá thì thường khó có thể kết luận chính xác về tác nhân gây bệnh. Mặc dù, đã có nhiều công trình nghiên cứu về đặc điểm sinh lý, sinh hóa, khả năng gây bệnh của vi khuẩn *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. trên nhiều loài cá trong và ngoài nước. Tuy nhiên, các công trình nghiên cứu về bệnh trên cá rô nhất là mô bệnh học còn hạn chế. Trong bài báo này chúng tôi cung cấp thông tin về những biến đổi mô học ở cá rô cảm nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. trong điều kiện phòng thí nghiệm bao gồm ảnh hưởng của sự cảm nhiễm vi khuẩn đến cấu trúc mô ở một số cơ quan của cá rô góp phần giúp cho việc chẩn đoán chính xác để việc điều trị bệnh đạt hiệu quả cao.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Cá rô giống mua ở Hậu Giang có trọng lượng từ 15-20g/con, cá tương đối đồng cỡ, khỏe mạnh. Cá giống sau khi mua về được dưỡng trong bể nhựa có sục khí khoảng một tuần và cho cá ăn thức ăn công nghiệp theo nhu cầu. Kiểm tra kí sinh trùng, vi sinh và tình trạng sức khỏe của cá trước khi bố trí thí nghiệm.

Vi khuẩn *A. hydrophila* chủng A11-02 và *Streptococcus* sp. chủng S11-01 từ bộ sưu tập vi khuẩn của Bộ môn Sinh học và Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, trường Đại học Cần Thơ được phân lập từ cá rô bị bệnh phù mắt và xuất huyết được sử dụng để gây cảm nhiễm. Vi khuẩn thuần được nuôi tăng sinh trong 100 ml môi trường Brain heart broth (Merck) và ủ trong tủ ấm ở 28°C (đối với *A. hydrophila*) và -35°C (đối với *Streptococcus* sp.) từ 24 – 48 giờ. Sau đó vi khuẩn được ly tâm với tốc độ 5.000 vòng/phút trong vòng 5 phút và được rửa 3 lần bằng nước muối sinh lý. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 540nm. Với OD = 1,2 ± 0,01 tương đương với 2,8x10⁸ CFU/ml.

2.2 Bố trí thí nghiệm

Bể nhựa 60L dùng để bố trí thí nghiệm với nguồn nước máy có sục khí 1 – 2 ngày trước khi thí nghiệm. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại bằng phương pháp tiêm ở gốc vi ngực gồm nghiệm thức: (1) tiêm chủng A11-02 với mật độ 2,75x10⁷ CFU/ml; (2) tiêm chủng S11-01 mật độ 2,87x10⁷ CFU/ml; (3) tiêm kết hợp chủng A11-02 và S11-01 với 3 mật độ vi khuẩn 10⁵, 10⁶ và 10⁷ CFU/ml; (4) tiêm nước muối sinh lý và (5) đối chứng không tiêm. Mật độ bố trí thí

nghiệm 10 con/bể, cá được tiêm 0,1ml/cá. Thí nghiệm được theo dõi trong vòng 14 ngày, trong quá trình bố trí thí nghiệm cho cá ăn bằng thức ăn viên theo nhu cầu.

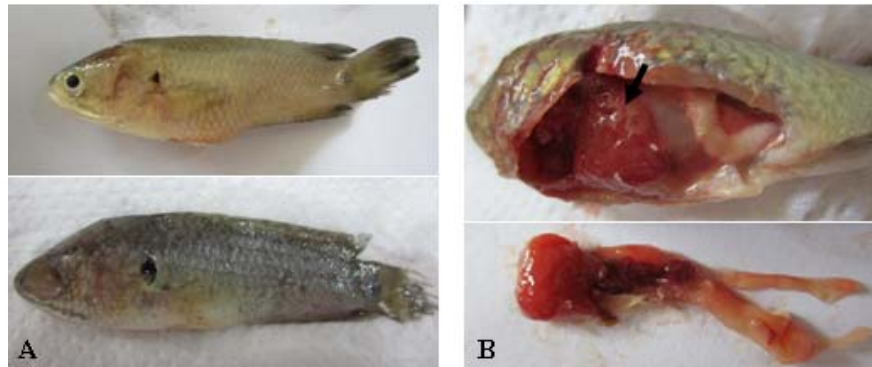
2.3 Phương pháp mô học

Mẫu được thu vào ngày thứ 1, 2, 3, 4, 5, và 14 sau cảm nhiễm gồm mẫu mô da-cơ, mang, gan, thận, tỳ tạng của cá bệnh (các nghiệm thức gây cảm nhiễm) và cá khỏe (nghiệm thức đối chứng), mẫu được thu và cố định trong dung dịch formol trung tính 10%. Mẫu được xử lý qua các giai đoạn: loại nước, làm trong mẫu và tẩm paraffin. Sau đó mẫu được đúc khối, cắt với độ dày từ 4-6µm và nhuộm Haematoxylin và Eosin, Giemsa. Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi lần lượt ở độ phóng đại 10x, 40x và 100x và chụp hình tiêu bản đặc trưng. Mẫu phết kính tiêu bản tươi mô gan, thận và tỳ tạng được nhuộm Gram và nhuộm Giemsa.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả cảm nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp.

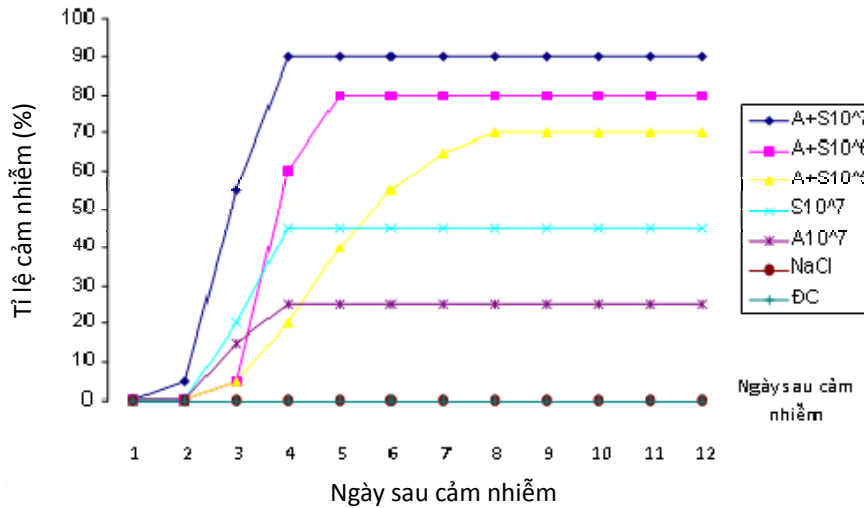
Ở các nghiệm thức cảm nhiễm tiêm đơn và kép vi khuẩn, cá nổi đầu, bơi lơ dờ mắt thẳng băng và chết. Bên ngoài cơ thể cá có màu nhạt, xuất huyết ở vây ngực và vây bụng, vây đuôi bị mòn, mang tái nhạt, bụng trương to. Một số cá có mắt bị xuất huyết, mờ đục, mắt một hay cả hai bên. Bên trong xoang bụng có chứa dịch, nội tạng bị xuất huyết, mềm nhũn. Gan và tỳ tạng xuất hiện đốm trắng, thận trước sung phù có màu tái nhợt (Hình 1). Kết quả này phù hợp với mô tả của Nguyễn Hữu Thịnh và ctv. (2011). Dấu hiệu bệnh lý tương tự cũng được ghi nhận ở cá điêu hồng nhiễm *S. agalactiae* (Đặng Thụy Mai Thy và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011); cá rô phi nhiễm *S. iniae* (Shoemaker et al., 2000; Evans et al., 2006), cá vàng và cá *Sparus aurata* nhiễm *A. hydrophila* (Rahman et al., 2001; Reyes-Becerril et al., 2011).



Hình 1: Dấu hiệu bệnh lý cá cảm nhiễm *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp.; A. ngoài; B. trong

Thời gian cá chết ở nghiệm thức tiêm chủng A11-02 và chủng S11-01 là ngày thứ 3 và 4 sau khi tiêm. Khi kết hợp 2 chủng vi khuẩn cá bắt đầu chết vào ngày thứ hai ở mật độ 10⁷ CFU/ml và kéo dài đến ngày thứ 4. Ở mật độ 10⁵ và 10⁶ CFU/ml cá chết ở ngày thứ 3. Ở nghiệm thức tiêm mật độ 10⁵ CFU/ml thời gian cá chết kéo dài đến ngày thứ 8. Ở các nghiệm thức còn lại, thời gian cá chết kéo dài từ 2 đến 4 ngày sau khi tiêm và sau đó không chết đến khi kết thúc thí nghiệm. Tỷ lệ cá chết ở

nghiệm thức tiêm một chủng vi khuẩn thấp hơn khi tiêm hai chủng vi khuẩn (Hình 2). Ở các mật độ vi khuẩn khác nhau cho thấy khi tiêm đơn chủng A11-02 có tỉ lệ cá chết (25%) thấp hơn chủng S11-01 (45%). Tuy nhiên, ở mật độ vi khuẩn 10^7 CFU/ml tiêm kết hợp 2 chủng A1-02 và chủng S11-01 có cá chết với tỉ lệ cao nhất (90%) sau 3 ngày cảm nhiễm. Tỉ lệ chết giảm (80% và 70%) ở mật độ vi khuẩn thấp (10^6 và 10^5 CFU/ml). Kết quả tái phân lập và định danh vi khuẩn cho thấy ở nghiệm thức tiêm đơn chỉ có một chủng vi khuẩn *A. hydrophila* hoặc *Streptococcus* sp.. Ở nghiệm thức tiêm kết hợp có 2 loại khuẩn lạc khi phân lập trên môi trường BHIA và định danh được 2 chủng vi khuẩn *Streptococcus* sp. và *A. hydrophila*

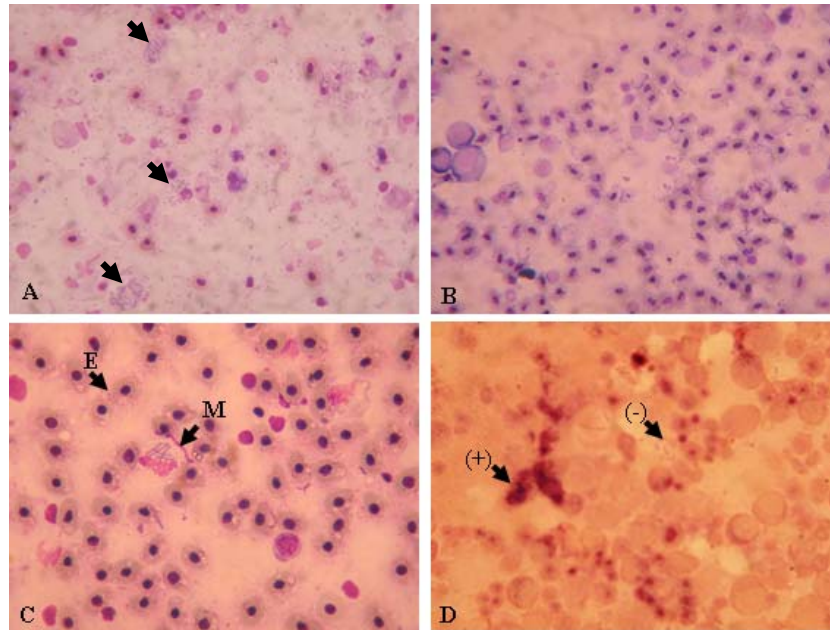


Hình 2: Tỉ lệ cá chết (%) theo ngày cảm nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp.

Esteve *et al.* (1993) gây cảm nhiễm *A. hydrophila* trên cá chình *Anguilla anguilla* với mật độ từ 10^4 - 10^9 CFU/ml cho thấy cá bắt đầu chết sau 18 giờ bằng phương pháp tiêm. Trên cá giếc *Carassius cuvieri* tiêm *A. hydrophila* nuôi trong môi trường thiếu dinh dưỡng với mật độ $2,4 \times 10^7$ CFU/ml có tỉ lệ chết (33,3%) cao hơn nuôi trong môi trường dinh dưỡng $2,5 \times 10^7$ CFU/ml (16,67%) (Rahman và Kawai, 1999). Rahman *et al.* (2001) cho thấy vi khuẩn này gây chết cá vàng *Carassius auratus* khi tiêm ở các vị trí như cơ, bụng và dưới da với tỉ lệ lần lượt là 66,7% và 83,3% ở mật độ vi khuẩn 10^7 CFU/ml. Gần đây, nghiên cứu của Das *et al.* (2011) trên cá *Puntius sarana* gây nhiễm *A. hydrophila* với mật độ $2,24 \times 10^7$ CFU/ml có tỉ lệ chết 44%. Tỉ lệ chết ảnh hưởng bởi mật độ cá rô phi thả và liều lượng vi khuẩn *S. iniae*. Ở mật độ vi khuẩn $2,5 \times 10^7$ CFU/ml có tỉ lệ chết thấp nhất 4,8% khi thả 25 con/bể nhưng ở mật độ 50 con/bể tỉ lệ chết lên đến 34,8% (Shoemaker *et al.*, 2000). Tương tự, *S. agalactiae* cũng làm chết cá rô phi với tỉ lệ 20-90% trong vòng 10 ngày sau khi tiêm với mật độ 10^1 - 10^8 CFU/ml (Suanyuk *et al.*, 2005). Ảnh hưởng của *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. cũng được chứng minh ở cá điêu hồng không tiêm vaccine có tỉ lệ chết 56,67% cao hơn so với cá không tiêm khi nhiễm *A. hydrophila*, tương tự với *Streptococcus* sp. (Prasad và Arechon, 2010).

3.2 Biến đổi cấu trúc mô quan sát bằng phết kính tiêu bản tươi

Quan sát các tiêu bản phết kính nhuộm Giemsa mô gan, thận, tỳ tạng mẫu cá bệnh thu ở nghiệm thức tiêm hai chủng A1-02 và S11-01 với mật độ khác nhau qua các ngày thu mẫu đều thấy có hai loại vi khuẩn hình cầu, kích thước khá nhỏ và hình que dài. Ngoài ra, phát hiện cầu khuẩn gram dương bắt màu xanh và trực khuẩn gram âm bắt màu hồng khi nhuộm Gram nằm rải rác trên vùng mô phết kính hoặc tập trung thành từng đám. Ở các nghiệm thức tiêm đơn cũng tìm thấy sự hiện diện của một loài vi khuẩn ở các cơ quan và hoàn toàn không tìm thấy ở các mẫu cá của nghiệm thức đối chứng (Hình 3). Kết quả tương tự cũng được mô tả ở cá chim bạc *Pampus argenteus* và điều hồng nhiễm *S. agalactiae* (Duremdez *et al.*, 2004; Đặng Thụy Mai Thy và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011).



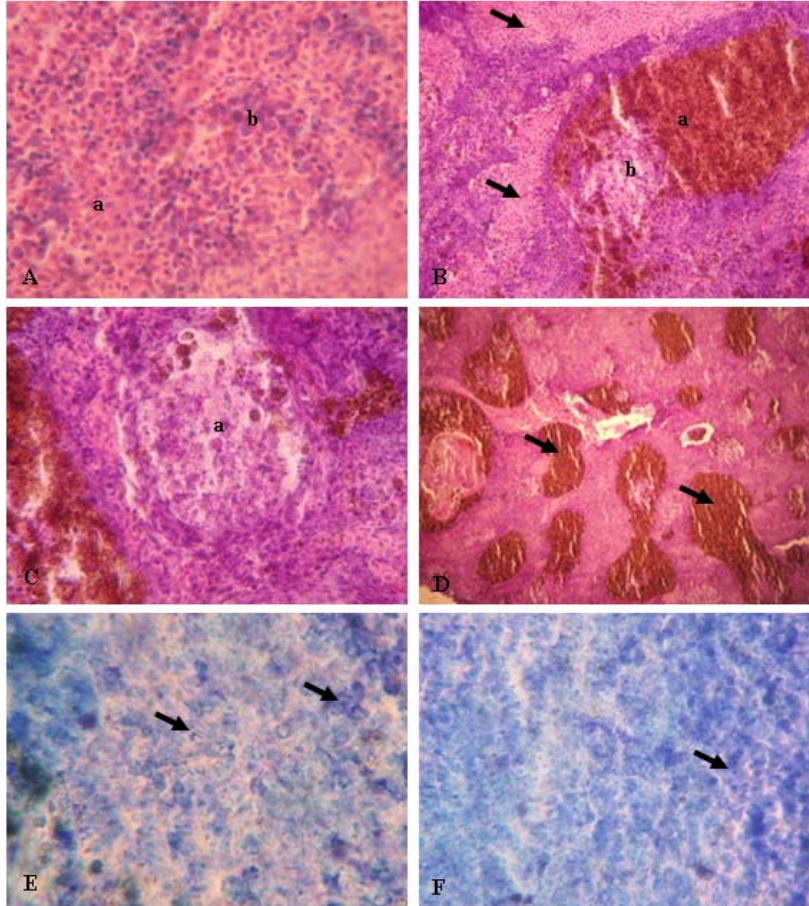
Hình 3: Mẫu phết kính cơ quan cá nhiễm *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. A: Vùng mô thận bị hoại tử với cụm vi khuẩn lớn (mũi tên). B: Cụm vi khuẩn tấn công bao quanh bạch cầu ở thận cá (mũi tên). C: Đại thực bào thực bào vi khuẩn hình que (M), cầu khuẩn phá vỡ tế bào hồng cầu (E) (Giemsa, 100x). D: Cầu khuẩn (+) và trực khuẩn (-) trong mô tỳ tạng (Gram, 100x)

3.3 Biến đổi cấu trúc mô học ở các cơ quan

3.3.1 Tỳ tạng

Tỳ tạng là một trong những cơ quan tạo máu, có hình thon dài và nằm dọc phía bên trái của dạ dày. Tỳ tạng gồm một lớp mỏng mô liên kết sợi và được bao phủ bởi một lớp tế bào biểu mô (Groman, 1982). Ở cá rô khoẻ mô tỳ tạng có cấu trúc gồm tủy đỏ và tủy trắng có nhiều hồng cầu và các giai đoạn khác nhau của bạch cầu hạt và có nhiều đại thực bào sắc tố (Hình 4A). Tuy nhiên, mô tỳ tạng cá bệnh ở các nghiệm thức tiêm đơn và kết hợp *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. với mật độ khác nhau qua các ngày thu mẫu ghi nhận được các hiện tượng xung huyết, xuất huyết, hoại tử với các mức độ biến đổi khác nhau phụ thuộc thời gian gây cảm nhiễm (Hình 4B và C). Tỳ tạng bắt đầu có hiện tượng xung và xuất huyết ở

ngày thu mẫu thứ 2 và 3 ở cá tiêm đơn và xuất hiện rất ít vi khuẩn trong mô. Ở cá gây nhiễm kép, biến đổi cấu trúc của tỳ tạng xảy ra ở các mật độ tiêm khác nhau. Ngày thu mẫu thứ nhất trên mô có nhiều vùng xuất huyết đến các ngày thứ 2, 3, 4 và 5 mô biến đổi cấu trúc ngày càng nhiều có nhiều vùng hoại tử hạt đến hoá lỏng. Lúc này trung tâm đại thực bào sắc tố giảm chuyển từ màu vàng nâu sang màu nâu tối và số lượng dày đặc trên mô (Hình 4D). Không tìm thấy sự biến đổi cấu trúc tỳ tạng nghiệm thức đối chứng và ngày thu mẫu cuối cùng.



Hình 4: Biến đổi mô tỳ tạng ở cá rô nhiễm *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. A: Mô tỳ tạng cá khoẻ. a: tủy đỏ; b: tủy trắng (HE, 100x). B: Vùng tế bào xung huyết (mũi tên). a: trung tâm đại thực bào sắc tố; b: hoại tử ở trung tâm đại thực bào sắc tố (HE, 40x). C: a: Vùng tế bào hoại tử hạt và có dịch viêm (HE, 100x). D: Trung tâm đại thực bào sắc tố tập trung nhiều trên mô tỳ tạng (HE, 10x). E: Vi khuẩn hình que trong mô tỳ tạng (mũi tên) (Giemsa, 100x). F: Vi khuẩn hình cầu trong mô tỳ tạng (Giemsa, 100x)

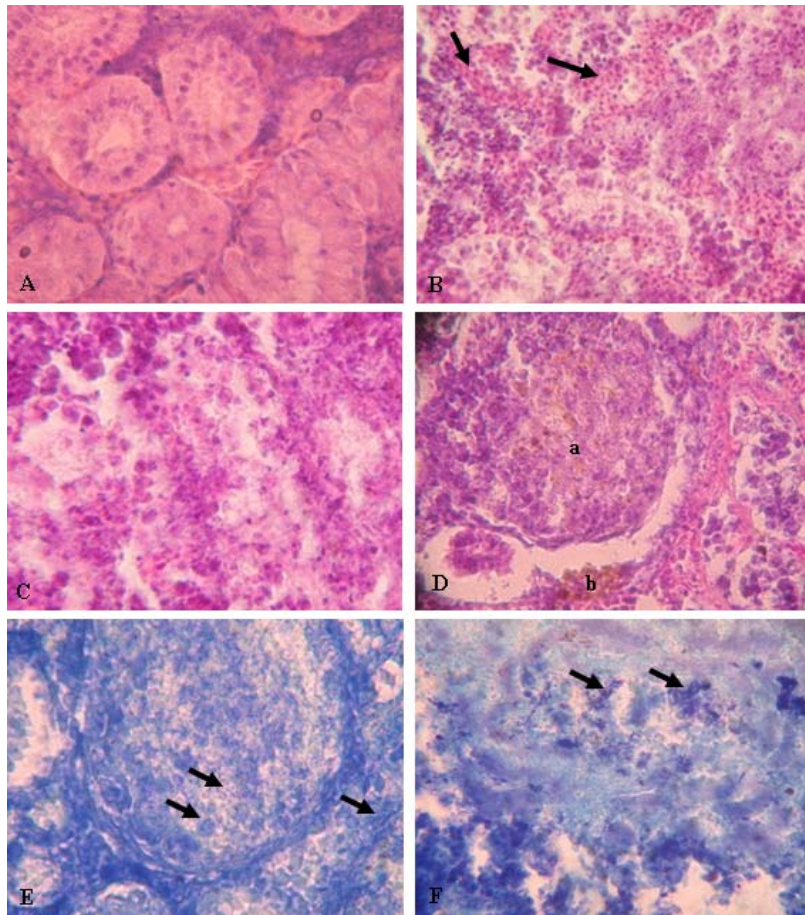
Cá bị xung huyết, xuất huyết và tế bào sưng viêm kéo dài dẫn đến những vùng hoại tử xuất hiện trên diện rộng cùng với sự phá hủy của trung tâm đại thực bào sắc tố sẽ làm cho tỳ tạng mất chức năng tạo bạch cầu và tế bào lympho chống lại tác nhân vi khuẩn gây bệnh, mất khả năng tiêu hủy hồng cầu già cũng như không thể tái tạo hồng cầu mới cung cấp cho cơ thể (Hybiya, 1982). Trung tâm đại thực bào sắc tố là một tập hợp đại thực bào có chứa các hạt sắc tố và có liên quan mật

thiết đến các nhánh của động mạch và tĩnh mạch tỳ tạng. Các hạt kháng nguyên như vi rút và vi khuẩn bị giữ lại ở các tế bào dạng bầu dục sau đó được chuyển đến trung tâm đại thực bào sắc tố bởi các đại thực bào (Morrison *et al.*, 2006). Ở cá bệnh mãn tính, có sự gia tăng tế bào ở tủy trắng đặc biệt là tế bào dạng thể bầu dục và trung tâm đại thực bào sắc tố. Màu sắc của trung tâm đại thực bào sắc tố cũng khác nhau ở cá khoẻ từ màu hồng đến vàng nâu nhưng có màu tối ở cá bệnh (Ferguson, 1989). Theo Ribelin and Migaki (1975) đại thực bào sắc tố đóng vai trò đặc biệt khi gây bệnh do *Aeromonas* trên cá hồi. Mô tạo máu nhiễm *Aeromonas* bị tấn công có chọn lọc bởi các sản phẩm của vi khuẩn và xảy ra hoại tử tác động đến đại thực bào sắc tố. Xuất hiện hoại tử nhiều ở một số đại thực bào sắc tố sau đó di chuyển đến các mạch của tỳ tạng và thận.

3.3.2 Thận

Thận sau cá rô nằm dọc sống lưng trong xoang cơ thể và phía trên của bóng hơi. Cấu trúc mô thận gồm đoạn cổ, ống lượn gần và ống lượn xa giúp thận thực hiện chức năng chủ yếu là điều hòa muối và nước trong cơ thể. Ngoài ra, giữa các ống có nhiều mao mạch xen kẽ nhưng có rất ít mô liên kết và mô tạo máu (Hình 5A). Ở cá rô nhiễm đơn và kép chủng A11-02 và S11-01 xảy ra các hiện tượng như xung huyết, xuất huyết, hoại tử ở thận. Quan sát mô thận nhiễm một chủng vi khuẩn cho thấy chủ yếu hiện tượng xuất huyết, xung huyết các mao mạch và tĩnh mạch ở ngày thu mẫu thứ 2. Đến ngày thứ 3, nhiều vùng tế bào bị biến đổi cấu trúc, hoại tử hạt xảy ra ở một số vùng trên mô thận (Hình 5B). Biểu hiện của sự xuất huyết trên mô là khi cơ quan bị viêm. Lúc này cơ thể sẽ huy động một lượng lớn các tế bào hồng cầu vùng bị viêm và khi quá trình này diễn ra quá mức dẫn đến các mao mạch bị vỡ làm cho các tế bào máu thoát ra ngoài xen lẫn với các tế bào của cơ quan, quá trình này kéo dài dẫn đến hoại tử mất cấu trúc (Robert, 1989).

Hiện tượng hoại tử hạt và sau đó là hoại tử gần như hóa lỏng được ghi nhận vào từ ngày thu mẫu thứ 3 đến 5 ở các nghiệm thức tiêm 2 chủng vi khuẩn có mật độ vi khuẩn 10^5 , 10^6 và 10^7 CFU/ml. Các ống thận mất cấu trúc và hoại tử đồng thời xuất hiện nhiều dịch viêm trong ống (Hình 5C). Nhiều vùng hoại tử lan rộng được tìm thấy trên mô thận và các đại thực bào sắc tố cũng xuất hiện tại đây. Tại các vùng hoại tử có nhiều cụm vi khuẩn hình cầu và hình que khi nhuộm Giemsa (Hình 5D&E). Ở một số mẫu cá thu được ở ngày thứ 4 khi tiêm kép với mật độ 10^7 CFU/ml ở lớp mô liên kết màng ngoài có nhiều vi khuẩn hình que tập trung thành từng đám khi nhuộm Giemsa (Hình 5F). Đây là giai đoạn ghi nhận cá bị bệnh nặng nhất với việc gần như biến mất của ống thận và tiểu cầu thận. Khi vi khuẩn xâm nhập vào tế bào chúng tiết độc tố dẫn đến sự phân hủy của các enzym trong tế bào gây nên hiện tượng hóa lỏng (Robert, 1978).



Hình 5: Biến đổi mô thận ở cá rô nhiễm *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. A: Mô thận cá khoẻ (HE, 100x). B: Xuất huyết và xung huyết nhiều vùng trên mô thận (HE, 100x). C: Hoại tử hoá lỏng các ống thận (HE, 100x). D: a: Vùng thận hoại tử hạt; b: trung tâm đại thực bào sắc tố (HE, 100x). E: Cụm cầu khuẩn và trực khuẩn ở vùng ống thận hoại tử (Giemsa, 100x). F: Cụm trực khuẩn ở mô liên kết ngoài (Giemsa, 100x)

Ở ngày thu mẫu cuối cùng mô thận chỉ có hiện tượng bị xung huyết có thể ở giai đoạn này cá đang phục hồi cấu trúc, lượng máu lớn tập trung ở thận để thực hiện trao đổi oxy cung cấp cho việc tái tạo cấu trúc cũng như đào thải chất độc và tác nhân gây bệnh (các tế bào bạch cầu và tế bào limpho). Thận bị hoại tử làm mất đi những chức năng quan trọng của thận như điều hòa áp suất thẩm thấu, bài tiết, sản xuất hồng cầu cũng như tiết hormone điều hòa các quá trình sinh lý của cơ thể. Không tìm thấy sự biến đổi cấu trúc mô ở cá đối chứng.

Kết quả nghiên cứu của Syanyuk *et al.* (2005) trên cá rô phi nhiễm *S. agalactiae* ở Thái Lan cho thấy có hiện tượng xuất huyết ở mô tạo máu và có sự thâm nhập của các tế bào lympho. Báo cáo tương tự của Filho *et al.* (2009) phát hiện các ống ở tỳ tạng và thận đều bị xung huyết. Trong lớp biểu mô trụ của ống lượn xa có nhiều giọt hyaline, sự thâm nhập của các đại thực bào cũng tìm thấy rất ít. Có nhiều cầu khuẩn ở lớp ngoại bào và bị thực bào được tìm thấy ở cá thu mẫu ngày 3, 7 và 14. Gần đây, nghiên cứu trên mô thận và tỳ tạng ở cá điêu hồng cảm nhiễm cùng loài

vi khuẩn với mật độ từ $4,23 \times 10^4$ - $4,23 \times 10^6$ CFU/ml bị thay đổi vào ngày thứ 3, biến đổi nặng hơn vào ngày thứ 5 và bị phá hủy ở ngày thứ 10 (Đặng Thụy Mai Thy và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011).

3.3.3 Gan

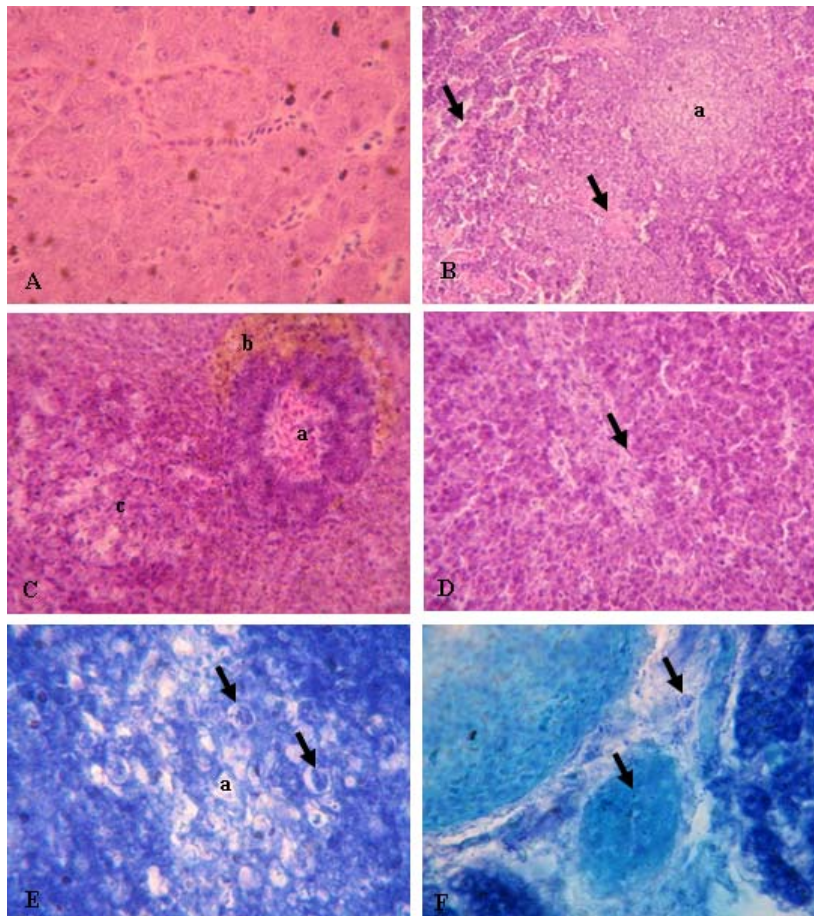
Gan có hình dạng như một khối lớn có thùy, phân chia màng ngoài tim và khoang bụng. Ở giữa gan có tĩnh mạch trung tâm, tuyến tụy nằm rải rác trên mô gan cá rô. Các tế bào gan có hình đa giác và sắp xếp lan tỏa theo tĩnh mạch trung tâm (Hình 6). Tế bào gan tồn trữ glycogen và chất béo, không bào ở gan xuất hiện khi hàm lượng chất béo tăng cao. Cấu trúc mô gan cá rô cũng được mô tả tương tự cá rô phi (Morrison *et al.*, 2006).

Nghiệm thức chỉ tiêm *A. hydrophila* hoặc *Streptococcus sp.* gan có các biểu hiện tương tự ở tỳ tạng và thậm chí là hoại tử. Tuy nhiên biến đổi cấu trúc mô gan chậm hơn. Ở ngày thu mẫu thứ 2 quan sát thấy các dây tế bào gan mất liên kết, xung huyết, xuất huyết, bắt đầu có hoại tử dạng hạt ở những mẫu thu ngày tiếp theo (Hình 6B). Biểu hiện này là do sự xung huyết trong hệ thống mao mạch nằm giữa các tế bào gan, quá trình này kéo dài dẫn đến vỡ mạch máu và giải thoát nhiều enzym tiêu hóa (tiêu hóa protein, lipid...) từ các tế bào bạch cầu làm cho tế bào ở vùng viêm bị hủy hoại dẫn đến hoại tử. Những tổn thương này làm cho gan không còn chức năng khử độc, lọc máu, chuyển hóa protein, lipid, glucid, tiết mật, làm cho chất độc không được loại bỏ sẽ tích lũy trong cơ thể kết hợp với các yếu tố khác làm cho cá chết (Robert, 1978).

Ở cá rô cảm nhiễm 2 chủng vi khuẩn, quan sát mô gan cho thấy có hiện tượng hoại tử xuất hiện nhiều trên tế bào gan và hoại tử ngày càng nghiêm trọng khi nhiễm với mật độ vi khuẩn 10^5 - 10^7 CFU/ml ở ngày thu mẫu thứ 4. Gan hoại tử gần như hóa lỏng, đảo tụy xuất huyết, vùng hoại tử tạo thành nhiều khoảng không bào. Tại vùng xung huyết tế bào máu phân hủy tạo thành dịch viêm, tế bào hồng cầu hủy hoại, nhân tan, tế bào chất trở nên đồng nhất bắt màu Eosin. Vi khuẩn được tìm thấy trong các mô kể ở gan. Đồng thời nhiều cụm vi khuẩn tồn tại trong tế bào gan và tạo các khoảng không bào trong mô gan ở mẫu nhuộm Giemsa (Hình 6C, D&E). Kết quả này giống với nghiên cứu biến đổi cấu trúc mô học ở cá *Fundulus grandis* nhiễm *Streptococcus sp.* cho thấy tế bào gan bị teo đồng thời với sự giảm glycogen và gia tăng không bào, thoái hóa và hoại tử tế bào (Rasheed *et al.*, 1985) hay ở cá rô phi nhiễm *S. agalactiae* (Suanyuk *et al.*, 2005; Filho *et al.*, 2009).

Nhìn chung khi khảo sát cấu trúc mô ở tỳ tạng, thận và gan cá rô nhiễm vi khuẩn có sự biến đổi qua các ngày thu mẫu ở tất cả các nghiệm thức. Trong đó mô thận, tỳ tạng bị biến đổi sớm nhất ở mật độ vi khuẩn 10^7 CFU/ml khi thu mẫu ở ngày thứ 1. Có thể nói rằng thận và tỳ tạng là cơ quan bị vi khuẩn tấn công đầu tiên. Tuy nhiên đến các ngày thu mẫu sau đó ở các nghiệm thức tiêm vi khuẩn 10^5 , 10^6 và 10^7 CFU/ml mô cá biến đổi ở cả 3 cơ quan gan, thận, tỳ tạng với các hiện tượng xung huyết, xuất huyết, hoại tử hoá lỏng. Điều này cho thấy ở thời điểm này độc lực vi khuẩn đủ mạnh gây chết cá số lượng nhiều và làm cho các cơ quan này bị hoại tử. Khi gan, thận, tỳ tạng hoại tử gần như hoàn toàn làm cho cá không còn thực hiện được quá trình trao đổi chất của cơ thể cùng với ảnh hưởng của độc tố vi khuẩn làm cho cá chết. Quan sát mô gan, thận, tỳ tạng bị hoại tử nặng, không có

khả năng phục hồi. Điều này cho thấy sức đề kháng của cá không đủ mạnh để đào thải các tác nhân gây bệnh làm cho cá chết.



Hình 6: Biến đổi mô gan ở cá rô nhiễm *A. hydrophila* và *Streptococcus* sp. A: Mô gan cá khỏe (HE, 100x). B: Mô gan xuất huyết (mũi tên), a: vùng tế bào bị biến đổi cấu trúc (HE, 40x). C: a: Tĩnh mạch bị xung huyết; b: trung tâm đại thực bào sắc tố; c: Hoại hạt ở tế bào gan (HE, 100x). D: Vùng thận hoại tử hạt; vi khuẩn nằm trong tế bào mô kẽ (mũi tên) (HE, 100x). E: Cụm vi khuẩn hình que trong tế bào gan; a: nhiều vùng hoại tử tạo khoảng không bào (Giemsa, 100x). F: Nhiều cụm cầu khuẩn và trực khuẩn ở mô liên kết ngoài và tĩnh mạch gan (Giemsa, 100x)

4 KẾT LUẬN

Cá rô cảm nhiễm *A. hydrophila* mật độ $2,75 \times 10^7$ CFU/m hoặc *Streptococcus* sp. mật độ $2,87 \times 10^7$ CFU/ml có tỉ lệ chết thấp (25% và 45%) so với cá nhiễm kép (90%). Cấu trúc mô tỳ tạng và thận biến đổi đầu tiên dưới ảnh hưởng của vi khuẩn gây bệnh. Gan biến đổi chậm hơn và các cơ quan đều có hiện tượng xung huyết, xuất huyết, hoại tử. Cá tiêm một chủng vi khuẩn có sự thay đổi ở mô ít hơn so với cá tiêm kép ở các mật độ vi khuẩn khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Austin, B. and C. Adam. 1996. Fish pathogen: The genus *Aeromonas*. John Wiley and Sons. 197-243p.
- Esteve, C., E.G. Biosca and C. Amaro. 1993. Virulence of *Aeromonas hydrophila* and some other bacteria isolated from European eels *Anguilla anguilla* reared in fresh water. *Diseases of Aquatic Organisms* (16): 15-20.
- Evans, J., P.H. Klesius and C.A. Shoemaker. 2006. *Streptococcus* in warm-water fish. *Aquaculture Health International*. 10-14
- Das, A., P.K. Sahoo, B.R. Mohanty and J.K. Jena. 2011. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in *Puntius sarana*: Early changes in blood and aspects of the innate immune-related gene expression in survivors. *Vet. Immunology and Immunopathology* (142): 207-218.
- Đặng Thụy Mai Thy và Đặng Thị Hoàng Oanh. 2011. Đặc điểm mô bệnh học ở cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*) nhiễm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* trong điều kiện thực nghiệm. Kỷ yếu Hội nghị khoa học thủy sản lần 4 : 289-301.
- Ferguson, H.W. 1989. Systemic pathology of fish. Iowa State University Press, USA. 247pp.
- Filho, C.I., E.E. Muller, L.G. Pretto-Giordano and A.P.F.R.L. Bracarense. 2009. Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brazil Journal Veterinary Pathology* (2):12-15.
- Groman, D.B. 1982. Histology of the striped bass. American Fisheries Society.
- Hybiya, T. 1982. An atlas of histology - Normal and Pathological features. College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon Univ. Tokyo, Japan. 146p.
- Nguyễn Hữu Thịnh, Bùi Thị Kim Cương và Đỗ Việt Phương. 2011. Một trường hợp nhiễm nặng *Trypanosoma sp.* trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*) nuôi thâm canh. Tạp chí khoa học Đại học Nông Lâm. 207-216
- Prasad, S. and N. Areechon. 2010. Efficacy of formalin-killed *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus sp.* vaccine in red tilapia. *Our Nature* (8):231-240.
- Rahman, M.H. and K. Kawai. 1999. Biological characteristics of starved *Aeromonas hydrophila* which contribute to virulence in crucian carp, *Carassius cuvieri*. *Mic. Research* (154): 145-149.
- Rahman, M.H., S. Suzuki and K. Kawai. 2001. The effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*. *Journal Apply Ichthyology* (17): 282-285.
- Rasheed, V., C. Limsuwan and J. Plump. Histopathological of bullminnows, *Fundulus grandis* Baird & Girard, infected with a non-haemolytic group B *Streptococcus sp.* *J. Fish Diseases* (8):65-74.
- Reyes-Becerril, M., T. Lopez-Medina, F. Ascencio-Valle and M.A. Esteban. 2011. Immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) following experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* (31): 564-570.
- Ribelin, W.E. and G. Migaki. 1975. The pathology of fishes. The University of Wisconsin Press. 1003pp.
- Robert, R.J. 1978. Fish pathology. Institute of Aquaculture, University of Stirling. Bailliere Tindall, London. 318 pp.
- Robinson, J.A. and F.P. Meyer, 1966. Streptococcal fish pathogen. *Journal of Bacteriology*, 92-512.
- Shoemaker, C.A., J.J. Evans and P.H. Klesius. 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* (188): 229-235.
- Suanyuk, N., H. Kanghear, R. Khongpradit and K. Supamattaya. 2005. *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Songklanakarin J. Sci. Tech.* (27):307-319.