

Phát hiện *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* trên cá rô phi (*Oreochromis* sp.) nuôi ở miền Bắc Việt Nam

**Trương Thị Mỹ Hạnh^{1*}, Nguyễn Diễm Thu², Nguyễn Thị Hạnh¹,
Nguyễn Hồng Bửu Vinh², Phan Trọng Bình¹, Lê Thị Mây¹,
Nguyễn Minh Quân¹, Đặng Thị Lua¹**

¹*Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I,
phường Từ Sơn, tỉnh Bắc Ninh, Việt Nam*

²*Công ty TNHH Virbac Việt Nam,
xã Bình Minh, tỉnh Đồng Nai, Việt Nam*

Ngày nhận bài 2/6/2025; ngày chuyển phản biện 4/6/2025;
ngày nhận phản biện 24/6/2025; ngày chấp nhận đăng 2/7/2025

Tóm tắt:

Nghiên cứu “Phát hiện *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* trên cá rô phi (*Oreochromis* sp.) nuôi ở miền Bắc Việt Nam” được thực hiện trong tháng 3/2025, khi nhiệt độ nước nuôi thủy sản tại miền Bắc phổ biến từ 22 đến 24°C. Cá rô phi và cá điêu hồng nuôi tại Bắc Ninh và Hải Dương (trước sắp nhập) ghi nhận các biểu hiện bệnh lý như lồi mắt, xuất huyết thân và đốm trắng ở thận, lách. Các dấu hiệu này, cùng điều kiện nhiệt độ (22-24°C), phù hợp với các mô tả về bệnh do *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (Fno) gây ra. Nghiên cứu đã tiến hành phân lập vi khuẩn bằng nuôi cấy trên môi trường modified Thayer-Martin agar và cysteine heart agar bổ sung máu bò. Các khuẩn lạc nghi ngờ được kiểm tra bằng kỹ thuật duplex PCR với 2 cặp mồi đặc hiệu (F11/R5, FnoF1/FnoR1) và giải trình tự 16S rRNA so sánh với các trình tự trong Ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST. Kết quả cho thấy, khuẩn lạc đặc trưng của Fno xuất hiện sau 5-7 ngày ủ ở nhiệt độ 25-26°C; toàn bộ 8/8 mẫu nghi ngờ đều dương tính với Fno bằng duplex PCR, với hai băng khuếch đại 1140 và 203 bp. Phân tích trình tự 16S rRNA xác nhận độ tương đồng 100% với các chủng Fno tham chiếu, đồng thời thí nghiệm gây nhiễm đã xác định Fno trong mô thận và chứng minh khả năng gây chết nhanh trên cá rô phi với liều 10⁷-10⁸ CFU/ml.

Từ khóa: cá rô phi, duplex PCR, *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, giải trình tự 16S rRNA.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.5, 4.6

Detection of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed tilapia (*Oreochromis* sp.) in Northern Vietnam

**Thị Mỹ Hạnh Trương^{1*}, Diễm Thu Nguyễn², Thị Hạnh Nguyễn¹,
Hong Bửu Vinh Nguyễn², Trọng Bình Phan¹, Thị Mây Lê¹,
Minh Quân Nguyễn¹, Thị Lua Đặng¹**

¹*Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I, Tu Sơn Ward, Bắc Ninh Province, Vietnam*

²*Virbac Vietnam Company Limited, Bình Minh Commune, Đồng Nai Province, Vietnam*

Received 2 June 2025; revised 24 June 2025; accepted 2 July 2025

*Tác giả liên hệ: Email: tmhanh@ria1.org

Abstract:

The study was conducted in March 2025, when water temperatures ranged from 22 to 24°C. Tilapia and red tilapia cultured in Bac Ninh and Hai Duong (prior to the merger) exhibited clinical signs including popeyes, body hemorrhages, and white spots in the kidney and spleen. These clinical signs, along with the environmental conditions (22-24°C), were consistent with previously reported descriptions of infection caused by *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (Fno). The bacterium was isolated using culture methods on modified Thayer-Martin agar and cysteine heart agar supplemented with bovine haemoglobin. Suspected colonies were further analysed using duplex PCR with two specific primer pairs (F11/R5 and FnoF1/FnoR1), and 16S rRNA gene sequencing was performed and compared to sequences in the NCBI database using the BLAST tool. Results showed that characteristic colonies of Fno emerged after 5-7 days of incubation at 25-26°C. All 08 suspected samples were tested positive for Fno by duplex PCR, displaying two distinct amplicons of 1140 and 203 bp. The 16S rRNA sequence analysis confirmed 100% identity with reference strains of Fno and the challenge experiment confirmed the presence of Fno in kidney tissue and demonstrated its rapid lethality in Nile tilapia at a dose of 10^7 - 10^8 CFU/ml.

Keywords: duplex PCR, *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, Tilapia, 16S rRNA sequencing.

Classification numbers: 1.6, 4.5, 4.6

1. Đặt vấn đề

Trên toàn cầu, sản lượng cá rô phi đã tăng từ 1,87 triệu tấn (năm 2000) lên 6,88 triệu tấn (năm 2018), trong đó châu Á và châu Phi là hai khu vực sản xuất chính, lần lượt chiếm 63,1 và 26,29% tổng sản lượng [1]. Tuy nhiên đến năm 2022, sản lượng cá rô phi giảm đạt 5,3 triệu tấn [2]. Các quốc gia sản xuất hàng đầu gồm: Trung Quốc (23,61%), Indonesia (18,76%), Ai Cập (17,04%), Bangladesh (5,01%), Brazil (4,94%), Philippines (4,67%), Việt Nam (3,78%), Thái Lan (3,40%) và Mexico (2,76%). Chỉ tính riêng Việt Nam, năm 2023, sản lượng cá rô phi đạt khoảng 270.000 tấn, tăng 3,8% so với năm 2022, với diện tích nuôi khoảng 30.000 ha [3]. Mục tiêu đến năm 2030 là mở rộng diện tích nuôi lên 40.000 ha, nâng thể tích lồng nuôi lên 1,8 triệu m³ và đạt sản lượng 400.000 tấn, trong đó 45-50% dành cho xuất khẩu [4]. Tuy nhiên trong quá trình nuôi, dịch bệnh là một trong số yếu tố ảnh hưởng đến sản lượng cá, trong số đó đã ghi nhận một số tác nhân như *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, *F. columnare*, *E. ictaluri* [5, 6].

Vi khuẩn *Francisella noatunensis* bao gồm hai phân loài: *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (Fno) và *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* (Fnn). Đây là vi khuẩn gram âm, không di động, có khả năng sống nội bào tùy ý, thuộc họ *Francisellaceae* trong lớp *Gammaproteobacteria* [7]. Chúng là tác nhân gây bệnh Francisellosis, một bệnh u hạt mãn tính ảnh hưởng đến nhiều loài cá nuôi [7]. Phân loài Fno ảnh hưởng đến cá nước ấm và đã được báo cáo rộng rãi trong ngành nuôi cá rô phi trên toàn thế giới [8]. Các trường hợp nhiễm bệnh đầu tiên được ghi nhận tại Đài Loan (Trung Quốc) năm 1992 [9], tiếp theo là Hawaii năm 1994 [10] và nhiều khu vực khác như Florida, California, Nam Carolina (Mỹ) năm 2004 [11], Costa Rica năm 2006 [12], Indonesia năm 2007 [13],

Anh năm 2010 [14], Thái Lan năm 2013 [15] và gần đây nhất là Trung Quốc năm 2023 [16]. Trong khi đó, Fnn chủ yếu gây bệnh trên các loài cá nước lạnh, đặc biệt là cá tuyết Đại Tây Dương, với các ca bệnh đã được ghi nhận tại Na Uy [13].

Tại miền Bắc Việt Nam, trong vài năm gần đây thực tế khi nhóm nghiên cứu thực hiện hoạt động quan trắc vùng nuôi cá rô phi tập trung nhận thấy, khi nhiệt độ dao động từ 20 đến 26°C, cá rô phi có biểu hiện bệnh lý như lồi mắt, đốm trắng ở thận và lách, kèm theo tỷ lệ chết đáng kể. Những dấu hiệu đặc trưng này trùng khớp với các triệu chứng do vi khuẩn Fno gây ra ở cá rô phi, đã được nhiều nghiên cứu quốc tế ghi nhận. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định sự hiện diện của Fno trên cá rô phi nuôi tại các tỉnh phía Bắc Việt Nam.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thời gian, địa điểm và phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện vào tháng 3/2025 trên 8 mẫu cá bệnh có biểu hiện bệnh lý điển hình, được thu thập tại hai tỉnh Bắc Ninh và Hải Dương.

Các mẫu được phân tích tại hai phòng thí nghiệm: 1) Trung tâm Quan trắc Môi trường và Bệnh thủy sản miền Bắc, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I, 2) Trung tâm Công nghệ Thủy sản (VATC) - Công ty Virbac (xã Bình Minh, tỉnh Đồng Nai, Việt Nam).

Mẫu cá rô phi và cá điêu hồng được bảo quản với đá lạnh (nhiệt độ 4-8°C) trong suốt quá trình vận chuyển cho đến khi tiến hành phân tích.

2.2. Phương pháp phân tích mẫu

- Đối với nuôi cấy phân lập bằng phương pháp truyền thống

Áp dụng phương pháp của E. Soto và cs (2009) [12], vi khuẩn sẽ được thu tập trung từ thận trước, thận sau và lách của mẫu cá rô phi/điều hồng. Mẫu được cấy lên môi trường modified Thayer-Martin agar và môi trường chọn lọc cysteine heart agar có bổ sung 2% máu bò (2% bovine haemoglobin). Các đĩa cấy sẽ được ủ ở nhiệt độ 25-26°C trong 5-7 ngày. Các chủng Fno nghi ngờ là khuẩn lạc tròn, bờ đều, đường kính <1 mm, bề mặt khuẩn lạc nhẵn bóng, màu trắng ngà, phát triển trên đĩa thạch sau 5 ngày ủ, sẽ được chọn cấy thuần và được xác nhận có phải là Fno bằng duplex PCR [17].

- Đối với phương pháp phân tích sinh học phân tử (duplex PCR)

Tất cả các khuẩn lạc Fno nghi ngờ, mọc trên đĩa thạch sau 5-7 ngày ủ, được xác định loài Fno bằng phương pháp duplex PCR. Các chủng vi khuẩn nghi ngờ Fno được tách chiết DNA bằng bộ kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các DNA được chiết xuất này sau đó được định lượng bằng máy quang phổ Nanodrop (Maestrogen). DNA chiết xuất được bảo quản trong ống vô trùng ở -20°C cho đến khi cần sử dụng.

Kỹ thuật duplex PCR được áp dụng trong nghiên cứu theo phương pháp của H.T. Dong và cs (2016) [17]. Hai cặp mồi F11/R5 và FnoF1/FnoR1 (bảng 1) với gen đích dựa trên 16S rDNA đặc hiệu phát hiện *Francisella* [18] và một trình tự riêng duy nhất từ Fno [17] khuếch đại sản phẩm tương ứng 1140 và 203 bp. PCR được thực hiện trong hỗn hợp phản ứng 25 µl, chứa 12,5 µl 2X PCRBIO Taq Mix Red (PCR Biosystems, UK), 2,0 µl

(0,8 μ M) của mỗi mồi F11 và R5, 0,5 μ l (0,2 μ M) của mỗi mồi FnoF1 và FnoR1, 5,0 μ l mẫu DNA (150-200 ng) và 2,5 μ l nước. Khuếch đại PCR được chạy trên máy luân nhiệt S1000 (Bio-Rad) sử dụng điều kiện chu kỳ theo H.T. Dong và cs (2016) [17], chu trình nhiệt áp dụng như sau: 94°C (3 phút), [35 chu kỳ (94°C - 30 giây, 60°C - 60 giây, 72°C - 60 giây)], 72°C (5 phút) và 4°C (∞). Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1% trong dung dịch 1X TAE và đọc kết quả dưới đèn UV.

Bảng 1. Trình tự mồi phát hiện Fno bằng duplex PCR.

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Sản phẩm (bp)	Tác giả
F11	TAC CAG TTG GAA ACG ACT GT	1140	M. Forsman và cs (1994) [18]
R5	CCT TTC TGA GTT TCG CTC C		
FnoF1	GGCGTAACTCCTTTTAGCTTCC	203	H.T. Dong và cs (2016) [17]
FnoR1	TTAGAGGAGCTTGGAAGCA		

2.3. Định danh loài bằng giải trình tự 16S rRNA

Các chủng Fno nghi ngờ được cấy trên đĩa thạch CHAH và gửi đến Công ty TNHH Thương mại và Dịch vụ Nam Khoa để giải trình tự 16S rRNA. Kết quả giải trình tự gen được so sánh về độ tương đồng trình tự trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng chương trình BLAST.

2.4. Phương pháp gây nhiễm chủng Fno phân lập

Chuẩn bị vi khuẩn: Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong dung dịch canh Tryptic Soy Broth bổ sung 1% D-glucose và 0,2% cysteine (MTSB) ở 25-26°C trong 24 giờ. Mật độ vi khuẩn sau nuôi cấy được điều chỉnh về khoảng 1×10^8 CFU/ml bằng phương pháp đo mật độ quang (OD600), kết hợp trang cấy trên đĩa thạch, dịch vi khuẩn sau đó được ly tâm loại bỏ môi trường TSB, tiếp đến pha loãng vi khuẩn trong dung dịch PBS ở nồng độ là 10^7 và 10^8 CFU/ml.

Chuẩn bị cá thí nghiệm: Cá rô phi phản xạ nhanh, sáng màu, kiểm tra âm tính với TiLV, ký sinh trùng và Fno (n81), trọng lượng trung bình 9,5 g/con được vận chuyển từ trại giống về phòng thí nghiệm. Cá được nuôi thuần ở bể thể tích 1 m³ trong thời gian một tuần trước khi tiêm gây nhiễm. Bể nuôi được bố trí sục khí vừa phải và đảm bảo các yếu tố môi trường trong khoảng phù hợp cho cá sinh trưởng. Cá được cho ăn cám công nghiệp 2 lần/ngày và theo dõi sức khỏe trong suốt thời gian nuôi thuần. Trước khi tiến hành cảm nhiễm, bắt ngẫu nhiên 5 con cá để kiểm tra, đánh giá lâm sàng và nuôi cấy, phân lập vi khuẩn từ thận cá. Tất cả cá sử dụng cho thí nghiệm gây nhiễm đảm bảo không có biểu hiện bệnh lý bất thường và không có vi khuẩn phát triển sau nuôi cấy.

Thí nghiệm được bố trí với 3 lô: Hai lô tiêm dịch vi khuẩn Fno ở hai nồng độ khác nhau (10^7 và 10^8 CFU/ml) và một lô đối chứng tiêm dung dịch PBS. Với mỗi nồng độ vi khuẩn, 9 cá rô phi được tiêm xoang bụng với thể tích 0,1 ml dịch vi khuẩn/cá rô phi. Các cá thí nghiệm được nuôi và theo dõi trong các bể có thể tích 150 l. Mỗi nồng độ được bố trí lặp lại 3 lần (bảng 2). Sau khi tiêm, cá được nuôi theo dõi ở nhiệt độ 23-25°C, là khoảng nhiệt độ thích hợp để vi khuẩn Fno biểu hiện khả năng gây bệnh. Các yếu tố môi trường như pH (7,0-7,5) và sục khí liên tục 24/24 giờ được duy trì đồng đều giữa các bể và đảm

bảo phù hợp với điều kiện phát triển bình thường của cá rô phi. Số lượng cá chết được ghi nhận hằng ngày để tính toán tỷ lệ chết tích lũy sau gây nhiễm. Các cá có biểu hiện bệnh được quan sát triệu chứng lâm sàng, trong khi cá chết được mổ khám nhằm phát hiện tổn thương bệnh lý và cấy rìa mô thận lên môi trường cysteine heart agar bổ sung 2% máu bò (CHAH) để tái phân lập và xác nhận lại tác nhân gây bệnh sau gây nhiễm.

Bảng 2. Thiết kế thí nghiệm gây nhiễm Fno (9 cá/bể, 3 bể/nghiệm thức).

STT	Nghiệm thức	Nồng độ vi khuẩn (CFU/ml)	Số cá/nghiệm thức	Phương pháp gây nhiễm
1	Fno liều 1	10^8	27	Tiêm xoang bụng (0,1 ml/con)
2	Fno liều 2	10^7	27	
3	Đối chứng âm	PBS	27	
Tổng cá			81	

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Tỷ lệ chết tích lũy của cá trong quá trình cảm nhiễm được phân tích thống kê mô tả bằng phần mềm Excel 2021, thể hiện dưới dạng giá trị trung bình.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đặc điểm bệnh lý cá nhiễm khuẩn *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*

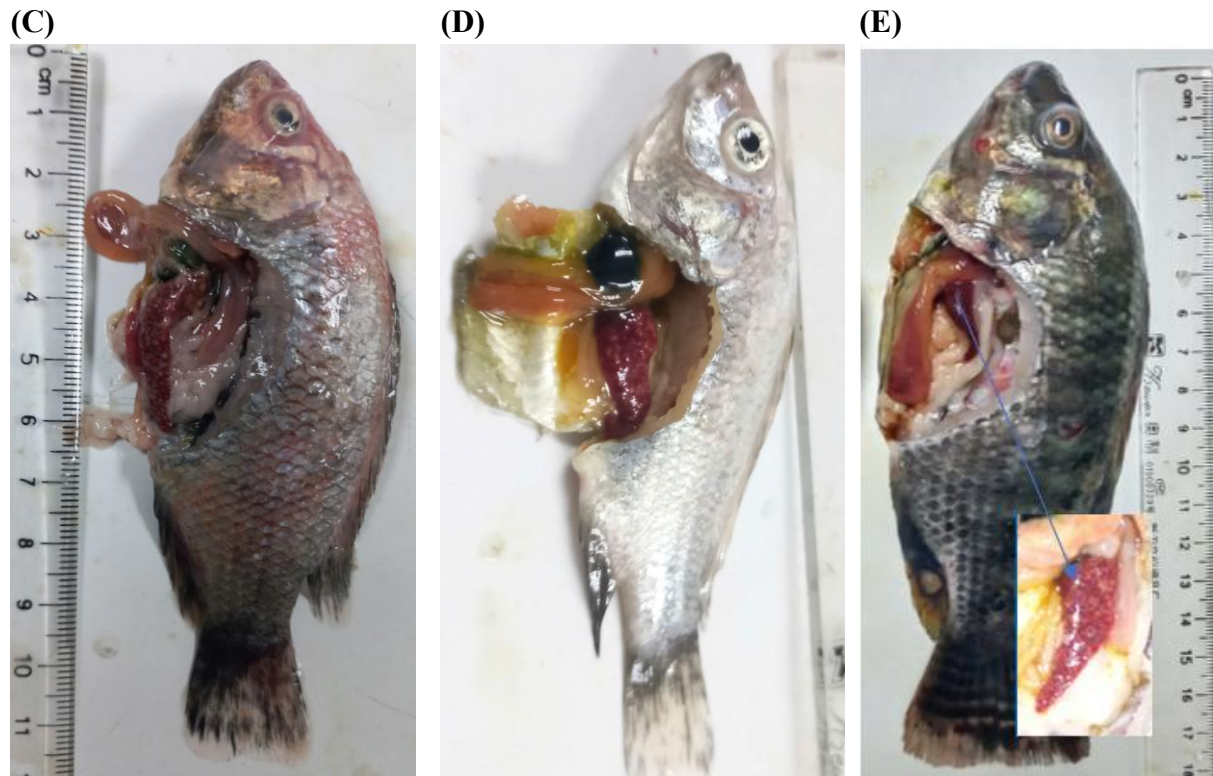
Nghiên cứu đã thực hiện thu mẫu tại 3 địa điểm thuộc 2 tỉnh Bắc Ninh và Hải Dương, tổng cộng 8 mẫu cá, bao gồm 2 cá rô phi và 6 cá điêu hồng với biểu hiện bệnh lý rõ rệt. Tại huyện Thuận Thành (Bắc Ninh), 3 mẫu cá điêu hồng có kích cỡ trung bình $26,3 \pm 6,7$ g, với các dấu hiệu như mắt lồi, xuất huyết thân, mật sưng và lách xuất hiện nhiều đốm trắng (hình 1). Tại huyện Lương Tài (Bắc Ninh), 2 mẫu cá rô phi có kích cỡ lớn hơn ($80,8 \pm 25,3$ g) cũng có biểu hiện mắt lồi, xuất huyết gốc vây và lách có nhiều đốm trắng. Trong khi đó, tại huyện Nam Sách (Hải Dương), 3 mẫu cá điêu hồng ($86,5 \pm 42,7$ g) bị xuất huyết ở nắp mang, mắt sắc tố ở vây và cơ quan thận lách có nhiều đốm trắng (hình 1). Tại các lồng nuôi cá bị bệnh, tỷ lệ chết được ghi nhận dao động 10-40% với cỡ cá 26-86 g/con trong điều kiện 22-24°C và có ý nghĩa về mặt dịch tễ (bảng 3). Trên thế giới, một số nghiên cứu cũng báo cáo các mức độ tử vong khác nhau do Fno, cụ thể: 75% ở cá rô phi cỡ 40-60 g ở 28°C [19], 20-95% trong các trại nuôi cá thương phẩm với trọng lượng 100-300 g ở nhiệt độ nước 25-30°C [20], 60-80% trong thử nghiệm tiêm vi khuẩn vào cá 50 g ở 27-29°C [21] và 40-70% trong các ổ dịch tự nhiên ở Mỹ, chủ yếu xảy ra khi cá đạt kích cỡ thương phẩm 200-500 g và nhiệt độ nước duy trì ở mức 26-30°C [22].

(A)



(B)





Hình 1. Biểu hiện bệnh lý của cá rô phi/điều hồng có kết quả dương tính Fno: (A) lồi mắt, (B, C) xuất huyết thân, (C, D) đốm trắng ở lách, thận, mật sung, (D, E) mất sắc tố ở vảy.

Bảng 3. Thông tin các mẫu thu phân tích trong nghiên cứu.

Địa điểm thu mẫu	Số mẫu	Loài cá	Cỡ cá (g/con)	Dấu hiệu bệnh lý	Tỷ lệ chết tích lũy ^(*) (%)
Thuận Thành, Bắc Ninh	03	Điêu hồng	26,3±6,7	Mất lồi, xuất huyết thân, mật sung, lách nhiều đốm trắng	10
Lương Tài, Bắc Ninh	02	Rô phi	80,8±25,3	Xuất huyết gốc vây, thận và lách xuất hiện đốm trắng, mất sắc tố ở vảy	30
Nam Sách, Hải Dương	03	Điêu hồng	86,5±42,7	Xuất huyết nắp mang, mất sắc tố ở vảy, thận và lách xuất hiện đốm trắng	40

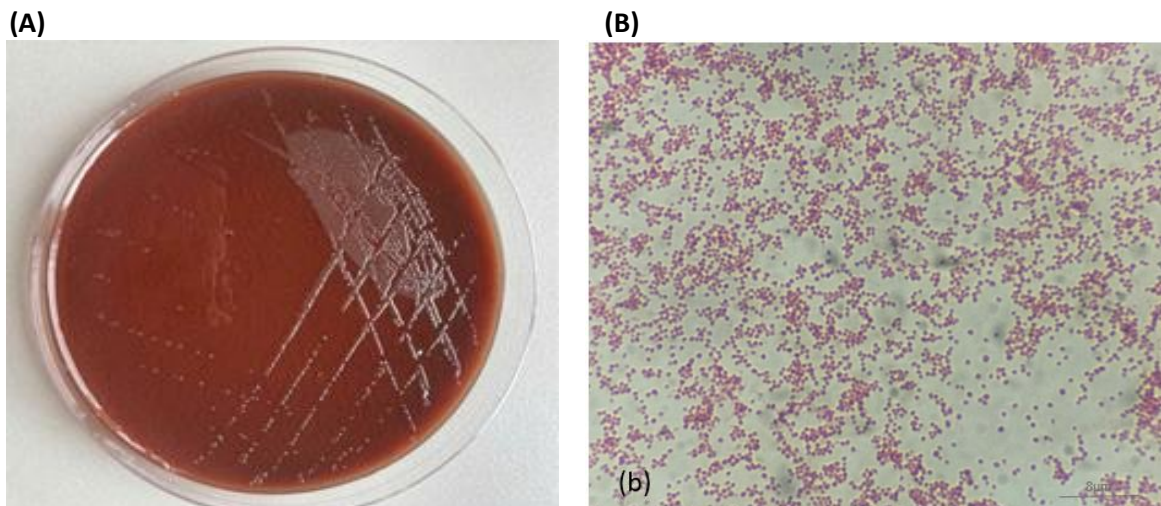
Ghi chú: Cỡ cá: giá trị trung bình $\pm$ SD, tại Bắc Ninh cá rô phi và điêu hồng nuôi ao, tại Hải Dương cá điêu hồng nuôi lồng. (*) Tỷ lệ được tính từ khi chủ hộ nuôi phát hiện cá chết có biểu hiện như mô tả đến khi cá dừng chết.

Những biểu hiện bệnh lý ghi nhận được nêu trên phù hợp với các mô tả về triệu chứng nhiễm Fno trên cá rô phi tại các quốc gia khác như Đài Loan (Trung Quốc) [9], Costa Rica [12] và Thái Lan [15]. Đặc điểm tổn thương dạng đốm trắng ở lách và thận là điển hình cho phản ứng viêm u hạt do Fno gây ra [23] và có thể được sử dụng làm tiêu chí lâm sàng quan trọng trong chẩn đoán và giám sát dịch bệnh ở các vùng nuôi cá rô phi có điều kiện nhiệt độ 20-26°C [16].

3.2. Phân tích nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường dinh dưỡng

Từ các mẫu cá nghi nhiễm bệnh, tổ chức thận trước, thận sau và lách được cấy trên môi trường dinh dưỡng: modified Thayer-Martin agar và môi trường chọn lọc cysteine heart agar có bổ sung 2% máu bò (2% bovine haemoglobin) (CHAH). Sau thời gian ủ từ 5-7 ngày ở nhiệt độ 26°C, trên môi trường xuất hiện các khuẩn lạc nhỏ, có đặc điểm:

Khuẩn lạc tròn nhỏ, bờ đều, đường kính <1 mm, bề mặt khuẩn lạc nhẵn bóng, màu trắng ngà (hình 2A), khi nhuộm gram, vi khuẩn bắt màu hồng, dạng trực khuẩn ngắn (hình 2B). Thời gian phát triển chậm, chỉ có thể quan sát rõ rệt sau 5 ngày ủ. Những đặc điểm này phù hợp với mô tả về sự phát triển của Fno trên môi trường nuôi cấy dinh dưỡng [7, 12]. Kết quả này cho thấy, Fno có khả năng phát triển ở điều kiện nước ấm và nhiệt độ trung bình trong khoảng 24-26°C, điều kiện phổ biến ở các vùng nuôi cá rô phi ở khu vực miền Bắc, Việt Nam vào mùa xuân. Toàn bộ 8 mẫu khuẩn lạc nghi ngờ đã được lựa chọn để tiếp tục kiểm tra bằng kỹ thuật duplex PCR nhằm xác định chính xác loài vi khuẩn.

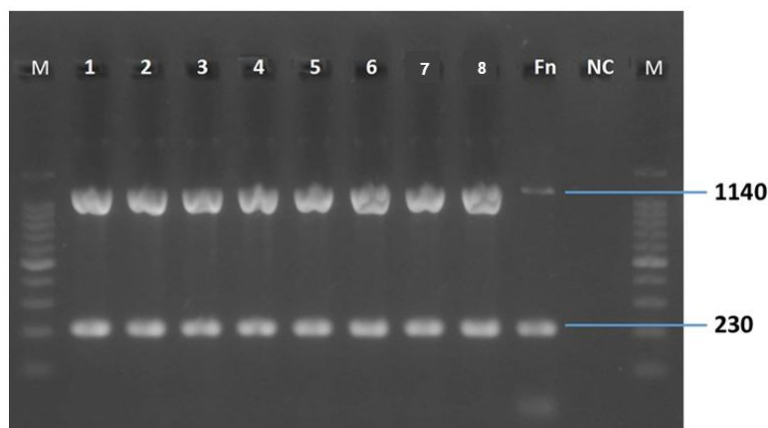


Hình 2. Vi khuẩn *Francisella noatunensis* subsp. *Orientalis*. (A) Hình thái khuẩn lạc trên môi trường CHAH; (B) Hình thái Fno nhuộm gram.

Kết quả nuôi cấy vi khuẩn cho thấy, Fno có thể được phân lập từ mô thận và lách của cá rô phi và cá điêu hồng có biểu hiện bệnh lý lồi mắt, xuất huyết, đốm trắng nội tạng (thận lách) trong điều kiện nuôi ở nhiệt độ 26°C, dù đòi hỏi thời gian nuôi cấy dài hơn so với các vi khuẩn thông thường. Việc sử dụng môi trường chuyên biệt có bổ sung cysteine và máu bò được xác định là cần thiết để tối ưu hóa khả năng phân lập.

3.3. Phân tích kỹ thuật PCR

Kết quả phân tích bằng kỹ thuật duplex PCR cho thấy 8/8 khuẩn lạc nghi ngờ nuôi cấy từ mô thận, lách tương ứng đều cho kết quả dương tính với Fno. Cụ thể khi điện di sản phẩm PCR trên bản gel agarose 1%, 8 mẫu phân tích đều xuất hiện hai vạch khuếch đại đặc trưng. Vạch có kích thước khoảng 1140 bp, đại diện cho gen 16S rDNA đặc hiệu của chi *Francisella*, trong khi đó, vạch có kích thước khoảng 203 bp, đặc hiệu cho phân loài Fno (hình 3).



Hình 3. Duplex-PCR các mẫu Fno phân lập từ cá rô phi. Giếng M: thang DNA 100 bp; giếng 1-3 tương ứng ISN-25/017-25/019 (mẫu thu tại Thuận Thành, Bắc Ninh); giếng 4-5: ISN-25/020-25/021 (mẫu thu tại Lương Tài, Bắc Ninh); giếng 6-8 tương ứng ISN-25/022-25/024 (mẫu thu tại Nam sách, Hải Dương); giếng Fn: DNA Fno dương tính (VATC); giếng NC: đối chứng âm (nước).

Sự xuất hiện đồng thời của cả 2 vạch với kích thước lần lượt tương ứng 1140 và 230 bp trong mẫu phân tích khẳng định các khuẩn lạc mọc trên CHAH là vi khuẩn Fno. Kết quả này không chỉ ghi nhận sự hiện diện của Fno trong các mẫu cá rô phi/điều hồng bệnh mà còn là minh chứng về độ đặc hiệu và độ nhạy của phương pháp duplex PCR sử dụng 2 cặp mồi F11/R5 và FnoF1/FnoR1, kết quả trùng hợp với báo cáo của H.T. Dong và cs (2016) [17] và các nghiên cứu quốc tế khác như của nhóm tác giả S. Duodu và cs (2021) [24]. Việc triển khai kỹ thuật duplex PCR có ý nghĩa quan trọng trong việc hỗ trợ sàng lọc nhanh cá nhiễm bệnh tại thực địa, đặc biệt khi bệnh chưa biểu hiện rõ dấu hiệu lâm sàng.

3.4. Kết quả giải trình tự 16S rRNA

Để xác nhận kết quả nuôi cấy vi khuẩn, hai chủng đại diện nghi ngờ (ISN-25/017 và ISN-25/022) đã được gửi đi giải trình tự gen 16S rRNA. Kết quả phân tích chuỗi trình tự thu được so sánh với cơ sở dữ liệu Genbank bằng công cụ BLAST cho thấy: Hai chủng nuôi cấy nghi ngờ Fno có độ tương đồng 100% với chủng vi khuẩn Fno đã được công bố trước đó (hình 4). Việc sử dụng trình tự 16S rRNA là phương pháp được khuyến cáo rộng rãi để định danh chính xác vi khuẩn thuộc chi *Francisella* [16, 18] và là bước cuối cùng cần thiết trong hệ thống chẩn đoán bằng kỹ thuật phân tử. Kết quả giải trình tự đạt được trong nghiên cứu này đã củng cố minh chứng vi khuẩn nuôi cấy từ mô lách, thận cá bệnh là vi khuẩn Fno.

(A)

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy					
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
☒ select all 100 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Francisella noatunensis subsp. orientalis strain STIR-GUS-F27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Francisella orie...	2128	2128	100%	0.0	100.00%	2679	KP657897.1
☒ Francisella orientalis strain FNO44 chromosome, complete genome	Francisella orie...	2128	6359	100%	0.0	100.00%	1862368	CP022939.1
☒ Francisella noatunensis subsp. orientalis strain FNO135, complete genome	Francisella orie...	2128	6379	100%	0.0	100.00%	1862148	CP022946.1
☒ Francisella noatunensis subsp. orientalis strain FNO117, complete genome	Francisella orie...	2128	6366	100%	0.0	100.00%	1862139	CP022945.1
☒ Francisella sp. AF-01-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Francisella sp....	2128	2128	100%	0.0	100.00%	1520	AY928389.1
☒ Francisella noatunensis subsp. orientalis strain FNO191, complete genome	Francisella orie...	2128	6379	100%	0.0	100.00%	1862129	CP022948.1
☒ Francisella orientalis strain Etime-1 16S ribosomal RNA, partial sequence	Francisella orie...	2128	2128	100%	0.0	100.00%	1480	NR_112536.1
☒ Francisella noatunensis subsp. orientalis strain FNO364, complete genome	Francisella orie...	2128	6385	100%	0.0	100.00%	1862310	CP022952.1
☒ Francisella noatunensis subsp. orientalis strain FNO137, complete genome	Francisella orie...	2128	6379	100%	0.0	100.00%	1862215	CP022947.1

(B)

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show

100

☒

select all

100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Francisella noatunensis subsp. orientalis strain STIR-GUS-F27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence...	Francisella orien...	2130	2130	100%	0.0	100.00%	2679	KP657897.1
☒ Francisella orientalis strain FNO44 chromosome, complete genome	Francisella orien...	2130	6365	100%	0.0	100.00%	1862368	CP022939.1
☒ Francisella noatunensis subsp. orientalis strain FNO135, complete genome	Francisella orien...	2130	6385	100%	0.0	100.00%	1862148	CP022946.1
☒ Francisella noatunensis subsp. orientalis strain FNO117, complete genome	Francisella orien...	2130	6372	100%	0.0	100.00%	1862139	CP022945.1
☒ Francisella sp. AF-01-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Francisella sp. A...	2130	2130	100%	0.0	100.00%	1520	AY928389.1
☒ Francisella noatunensis subsp. orientalis strain FNO191, complete genome	Francisella orien...	2130	6385	100%	0.0	100.00%	1862129	CP022948.1
☒ Francisella orientalis strain Etime-1 16S ribosomal RNA, partial sequence	Francisella orien...	2130	2130	100%	0.0	100.00%	1480	NR_112536.1
☒ Francisella noatunensis subsp. orientalis strain FNO364, complete genome	Francisella orien...	2130	6390	100%	0.0	100.00%	1862310	CP022952.1
☒ Francisella noatunensis subsp. orientalis strain FNO137, complete genome	Francisella orien...	2130	6385	100%	0.0	100.00%	1862215	CP022947.1
☒ Francisella sp. AF-01-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Francisella sp. A...	2130	2130	100%	0.0	100.00%	1520	AY928388.1

Hình 4. Hình ảnh Blast gen của trình tự có độ tương đồng 100% với với *Francisella noatunensis subsp. orientalis* (Fno). (A) ISN-25/017 - mẫu thu Thuận Thành Bắc Ninh; (B) ISN-25/022- mẫu thu Nam Sách, Hải Dương.

3.5. Kết quả gây nhiễm Fno

Cá chết bắt đầu xuất hiện sau 24 giờ kể từ khi gây nhiễm vi khuẩn Fno với liều 10⁸ CFU/cá (ngày thứ 1) và toàn bộ cá chết (100%) vào ngày thứ 2 sau gây nhiễm. Ở nồng độ thấp hơn, hiện tượng cá chết xuất hiện chậm hơn (từ ngày thứ 2) và đạt tỷ lệ chết 100% vào ngày thứ 4 sau gây nhiễm (bảng 4). Cá chết có biểu hiện trướng bụng, tích dịch xoang bụng và xuất huyết ở vùng nắp mang (hình 5). Không ghi nhận cá chết hoặc biểu hiện bất thường ở nhóm đối chứng âm. Tất cả cá rô phi chết sau khi được gây nhiễm vi khuẩn Fno đều đã được phân lập thành công vi khuẩn từ cơ quan thận bằng cách nuôi cấy trên môi trường thạch CHAH (hình 6). Các khuẩn lạc thu được sau đó được xác nhận là Fno bằng phương pháp PCR duplex.

Bảng 4. Kết quả tỷ lệ chết tích lũy khi gây nhiễm Fno ở cá rô phi.

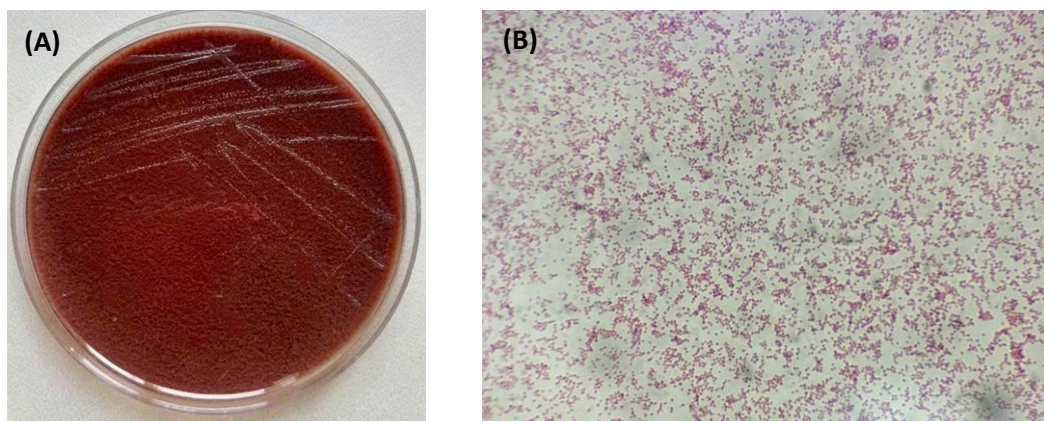
Nghiệm thức	Bể	Số cá chết theo ngày (5 ngày theo dõi)	Tổng số cá chết (con)	Tỷ lệ chết (%)	Ghi chú
NT1 (tiêm 0,1 ml hỗn dịch chứa 10 ⁸ cfu/ml)	T1	4-5-x-x-x	9	100	Xuất hiện sau 24 giờ gây nhiễm (ngày thứ 1) và chết 100% ở ngày 2
	T2	4-5-x-x-x	9		
	T3	3-6-x-x-x	9		
	T4	0-2-7-x-x	9	100	
	T5	0-5-2-2-x	9		

NT2 (tiêm 0,1 ml hỗn dịch chứa 10^7 cfu/ml)	T6	0-5-4-x-x	9		Xuất hiện sau 48 giờ gây nhiễm (ngày thứ 2) và chết 100% ở ngày 4
Đối chứng âm (PBS)	T7	0-0-0-0-0	0	0	Cá phân khỏe, phân xạ nhẹ
	T8	0-0-0-0-0	0		
	T9	0-0-0-0-0	0		

Ghi chú: n=9 cá/bể, 27 cá/nghiệm thức, x=hết cá trong bể.



Hình 5. Biểu hiện cá gây nhiễm sau 24 giờ. (A) Trướng bụng, xuất huyết nắp mang; (B) Xoang bụng tích dịch; (C) Mật sưng.



Hình 6. Vi khuẩn tái phân lập trên cá rô phi gây nhiễm Fno. (A) Khuẩn lạc mọc trên môi trường CHAH; (B) Hình thái vi khuẩn gram âm, trực khuẩn ngắn.

Kết quả cho thấy, liều gây nhiễm từ 10^7 đến 10^8 CFU/ml gây chết cá rất nhanh, ngay cả khi cá mới chỉ xuất hiện các dấu hiệu lâm sàng nhẹ như xuất huyết, mật sưng, tích dịch trong khoang bụng và chưa có biểu hiện điển hình là các đốm trắng ở thận và lách. Tuy nhiên, vi khuẩn Fno đã hiện diện trong cơ quan thận, được xác nhận thông qua kết quả phân lập và phân tích mẫu từ cá thí nghiệm.

Để thu được cá có biểu hiện triệu chứng bệnh lý điển hình hơn, nghiên cứu cần tiến hành gây nhiễm với các nồng độ vi khuẩn thấp hơn. Tuy nhiên, thí nghiệm này đã đạt được mục tiêu chính là xác định sự hiện diện của vi khuẩn Fno trên cá rô phi (*Oreochromis sp.*).

4. Kết luận

Nghiên cứu bước đầu ghi nhận sự xuất hiện của vi khuẩn Fno trên cá rô phi nuôi tại miền Bắc Việt Nam thông qua nuôi cấy vi khuẩn, kỹ thuật duplex-PCR và giải trình tự gen 16S rRNA.

Các đặc điểm có liên quan đến bệnh bao gồm nhiệt độ môi trường nuôi trong khoảng 22-24°C, cá nhiễm bệnh có dấu hiệu bệnh lý điển hình được ghi nhận lồi mắt, xuất huyết, mất sắc tố vảy và đặc biệt u hạt trắng ở thận và lách.

Thí nghiệm gây nhiễm đã xác định được sự hiện diện của vi khuẩn *Fno* trong mô thận thông qua nuôi cấy và PCR duplex, đồng thời chứng minh khả năng gây chết nhanh của vi khuẩn *Fno* trên cá rô phi với liều tiêm 10^7 - 10^8 CFU/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] FAO (2020), *The State of World Fisheries and Aquaculture*, DOI: 10.4060/cd0683en.

[2] K. Thompson, C. Shoemaker, D. C. Little (2025), *Tilapia: Aquaculture, Biology and Health Management*, CAB International, Oxfordshire, 861pp, DOI: 10.1079/9781800629455.0000.

[3] P. Hue (2024), “USSEC promotes efficient, safe, and sustainable aquaculture development in Vietnam”, *Shrimp Farmer Magazine*, <https://nguoينوitom.vn/ussec-thuc-day-viet-nam-phat-trien-ntts-hieu-qua-an-toan-va-ben-vung/>, accessed 1 March 2025 (in Vietnamese).

[4] Vietnam Ministry of Agriculture and Rural Development (2016), *Decision No. 1639/QĐ-BNN-TCTS, dated 6 May 2016, on Approving The Master Plan for Tilapia Farming Development to 2020, with Orientation Toward 2030* (in Vietnamese)..

[5] T.M.H. Truong, T.V. Phan, T.M. Le, et al. (2021), “Risk factors associated with Streptococcosis in freshwater farmed tilapia”, *Vietnam Journal of Science and Technology*, **63(7)**, pp.42-47 (in Vietnamese).

[6] T.N. Doan, T.L. Dang, V.V. Kim, et al. (2022), “Common and serious bacterial diseases in farmed tilapia: Current status and challenges in Vietnam”, *Journal of Veterinary Science and Technology*, **29(3)**, pp.86-97 (in Vietnamese).

[7] D.J. Colquhoun, S. Duodu (2011), “*Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms” *Veterinary Research*, **42(1)**, DOI: 10.1186/1297-9716-42-47.

[8] E. Soto, T. Schwedler, J. Hawke, et al. (2013), “*Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* pathogenesis analyzed by experimental immersion challenge in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)”, *Veterinary Microbiology*, DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.01.024.

[9] R.S. Chern, C.B. Chao (1994), “Outbreaks of a disease caused by rickettsia-like organism in cultured tilapias in Taiwan”, *Fish Pathology*, **29**, pp.61-71.

[10] M.J. Mauel, D.L. Miller, K. Frazier, et al. (2003), “Characterisation of a piscirickettsiosis-like disease in Hawaiian tilapia”, *Diseases of Aquatic Organisms*, **53(3)**, pp.249-255, DOI: 10.3354/dao053249.

[11] M.J. Mauel, D.L. Miller, E. Styer, et al. (2005), “Occurrence of Piscirickettsiosis-like syndrome in tilapia in the continental United States”, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **17(6)**, pp.601-605, DOI: 10.1177/104063870501700616.

[12] E. Soto, J.P. Hawke, D. Fernandez, et al. (2009) “*Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica”, *Journal of Fish Diseases*, **32(8)**, pp.713-722, DOI: 10.1111/j.1365-2761.2009.01070.x.

- [13] K.F. Ottem, A. Nylund, E. Karlsbakk, et al. (2009), “Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* to *Francisella noatunensis* comb. nov.[syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens”, *Journal of Applied Microbiology*, **106(4)**, pp.1231-1243, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.04092.x.
- [14] K.R. Jeffrey, D. Stone, S.W. Feist, et al. (2010), “An outbreak of disease caused by *Francisella* sp. in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at a recirculation fish farm in the UK”, *Diseases of Aquatic Organisms*, **91(2)**, pp.161-165, DOI: 10.3354/dao02260.
- [15] V.N. Vuong, T.D. Ha, T. Saengchan, et al. (2019), “Transmission of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from subclinically infected hybrid red tilapia broodstock (*Oreochromis* sp.) to their offspring”, *Microbial Pathogenesis*, **136**, DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103670.
- [16] M. Xu, F. Li, B. Chen, et al. (2025), “Isolation, identification and histopathological observation of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)”, *Aquaculture*, **595(1)**, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2024.741532.
- [17] H.T. Dong, H.D. Nguyen, T.M. Nguyen, et al. (2016), “Development of duplex PCR for the detection of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in tilapia (*Oreochromis* spp.)”, *Journal of Fish Diseases*, **39(2)**, pp.247-256.
- [18] M. Forsman, G. Sandström, A. Sjöstedt (1994), “Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44(1)**, pp.38-46, DOI: 10.1099/00207713-44-1-38.
- [19] E. Soto, J.P. Hawke, D. Fernandez, et al. (2012), “*Francisella* infections in tilapia: a review”, *Journal of Fish Diseases*, **35(10)**, pp.679-693, DOI: 10.1111/j.1365-2761.2012.01394.x.
- [20] M.A.A. Ishaq, K. Hatai, S. Ohtsuka (2013), “First isolation of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from hybrid tilapia in the Middle East”, *Aquaculture*, **35**, pp.406-407, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.05.022.
- [21] C.A.G. Leal, G.C. Tavares, H.C.P. Figueiredo, et al. (2014), “Pathogenesis of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)”, *Veterinary Microbiology*, **170(3-4)**, pp.456-464, DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.02.046.
- [22] J. Bebak, B. Wagner, B. Burnes, et al. (2015), “Outbreaks of francisellosis in commercial tilapia operations in the USA”, *Journal of Aquatic Animal Health*, **27(4)**, pp.242-247, DOI: 10.1080/08997659.2015.1082115.
- [23] C.Y. Hsieh, M.C. Tung, C. Tu, et al. (2006), “Enzootics of visceral granulomas associated with *Francisella*-like organism infection in tilapia (*Oreochromis* spp.)”, *Aquaculture*, **254(1-4)**, pp.129-138, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.03.044.
- [24] S. Duodu, D.J. Colquhoun, S. Mendez, et al. (2021), “*Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infection in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review of current status and future perspectives”, *Journal of Fish Diseases*, **44(6)**, pp.775-791, DOI: 10.1111/jfd.13310.