



DOI:10.22144/ctujos.2024.467

## PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ ĐẶC ĐIỂM CỦA VI KHUẨN *Vibrio mimicus* GÂY BỆNH LỞ LOÉT TRÊN CÁ TRÁ (*Pangasianodon hypophthalmus*) NUÔI Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Từ Thanh Dung<sup>1\*</sup>, Michael Stewart Kelly<sup>2</sup>, Nguyễn Bảo Trung<sup>1</sup>, Lê Minh Khôi<sup>1</sup>, Hoàng Thị Ngọc Đoan<sup>3</sup> và Quách Văn Cao Thi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Khoa Bệnh học Thủy sản, Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

<sup>2</sup>Học viên cao học ngành Nuôi trồng Thủy sản tiên tiến - khoá 6, Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

<sup>3</sup>Sinh viên ngành Bệnh học Thủy sản - khoá 43, Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

<sup>4</sup>Khoa Khoa học sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long, Việt Nam

\*Tác giả liên hệ (Corresponding author): ttdung@ctu.edu.vn

### Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 02/05/2024

Sửa bài (Revised): 02/07/2024

Duyệt đăng (Accepted): 03/08/2024

**Title:** Isolation, identification and characterization of *Vibrio mimicus* causing ulcerative disease striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in the Mekong Delta

**Author(s):** Tu Thanh Dung<sup>1\*</sup>, Michael Stewart Kelly<sup>2</sup>, Nguyen Bao Trung<sup>1</sup>, Le Minh Khoi<sup>1</sup>, Hoang Thi Ngoc Doan<sup>3</sup> and Quach Van Cao Thi<sup>4</sup>

**Affiliation(s):** <sup>1</sup>College of Aquaculture & Fisheries, Can Tho University, Can Tho City, Viet Nam; <sup>2</sup>Master Advanced Program in Aquaculture - Course 6, College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University, Can Tho City, Viet Nam; <sup>3</sup>Student in Aquatic animal Pathology - Course 43, College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University, Can Tho City, Viet Nam; <sup>4</sup>Faculty of Applied Biological Sciences, Vinh Long University of Technology Education, Vinh Long City, Viet Nam

### TÓM TẮT

Bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn xuất hiện trên cá tra ngày càng phổ biến, gây thiệt hại lớn cho người nuôi ở đồng bằng sông Cửu Long. Nghiên cứu thực hiện nhằm xác định vi khuẩn gây bệnh lở loét trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) tại ao nuôi ở An Giang, Cần Thơ và Đồng Tháp. Ba chủng vi khuẩn đại diện cho từng khu vực được phân lập từ cá tra bệnh có biểu hiện lở loét, đuôi mòn và nội tạng trương phồng. Thí nghiệm cảm nhiễm cho thấy ba chủng CT5, NV9 và VH120 có độc lực cao với giá trị LD<sub>50</sub> lần lượt là  $1,66 \times 10^4$  CFU/mL,  $3,98 \times 10^4$  CFU/mL và  $1,58 \times 10^3$  CFU/mL. Cá cảm nhiễm có các dấu hiệu bệnh lở loét tương tự cá bệnh ngoài tự nhiên. Tất cả các chủng vi khuẩn phân lập là Gram âm, oxidase, catalase, O/F dương tính và sử dụng glucose, galactose hoặc D-mannitol làm nguồn carbon. Giải trình tự 16S rRNA cho thấy ba chủng vi khuẩn phân lập có độ tương đồng 99,87% với vi khuẩn *Vibrio mimicus*. Đây là nghiên cứu đầu tiên xác định vi khuẩn *V. mimicus* là tác nhân gây bệnh lở loét trên cá tra nuôi thâm canh.

**Từ khóa:** Cá tra, đồng bằng sông Cửu Long, lở loét, *Vibrio mimicus*

### ABSTRACT

Infectious diseases caused by bacteria in striped catfish are increasingly common, causing huge losses to farmers. The study aimed to identify the bacterial pathogen that led to muscular necrosis disease in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) at fish farms in An Giang, Can Tho, and Dong Thap provinces of the Mekong Delta. Three bacterial strains representing each province were isolated from diseased striped catfish that exhibited clinical signs such as muscular necrosis, tail erosion, and enlarged internal organs. Screening tests revealed that isolates CT5, NV9, and VH120, were found to be highly pathogenic, with LD<sub>50</sub> values of  $1,66 \times 10^4$  CFU/mL,  $3,98 \times 10^4$  CFU/mL, and  $1,58 \times 10^3$  CFU/mL, respectively. The challenged fish with these strains exhibited symptoms similar to those observed in naturally infected fish. The bacterial isolates were identified as Gram-negative, oxidase-positive, catalase-positive, and O/F test-positive, utilizing glucose, galactose, or D-mannitol as carbon sources. 16S rRNA sequencing and phylogenetic analysis revealed that the isolates exhibited 99.87% similarity and clustered with *Vibrio mimicus*. This study is the first to identify *Vibrio mimicus* as the causative agent of muscular necrosis disease in intensively farmed pangasius in the Mekong Delta.

**Keywords:** Mekong Delta, striped catfish, ulcerative disease, *Vibrio mimicus*

## 1. GIỚI THIỆU

Cá tra (*P. hypophthalmus*) là một trong những đối tượng xuất khẩu quan trọng và mang lại nhiều giá trị kinh tế cho các hộ nuôi cá ở đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Báo cáo của Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2022) cho thấy cá tra chiếm 5,1% số loài nuôi trồng thủy sản chính trên thế giới vào năm 2020 với sản lượng 2.520,4 nghìn tấn. Với tốc độ tăng trưởng nhanh, nuôi ở mật độ cao và khả năng sinh sản tốt, đặc biệt do tỉ lệ thịt cao và không có xương phụ nên đây là loài cá có nhu cầu thị trường cao và được hầu hết người tiêu dùng chấp nhận (Datta & Ansal, 2020). Tuy nhiên, khi các hệ thống chăn nuôi mở rộng và việc thâm canh hóa với mật độ cao và quản lý môi trường ao nuôi chưa được kiểm soát chặt chẽ, mỗi nguy về sức khỏe và các vấn đề về dịch bệnh trên cá tra ngày càng tăng (Nahar et al., 2016). Trước đây, đã có nhiều báo cáo về vi khuẩn lây nhiễm trên cá tra như là *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* và *Flavobacterium columnare* (Crumlish et al., 2010; Dung et al., 2008; Dung et al., 2012; Ly et al., 2009; Tien et al., 2012). Đáng chú ý, sự phân hoá về loài *A. hydrophila* và *A. dhakensis* được phát hiện trên cá tra trong những năm gần đây cho thấy khả năng biến đổi và tạo thành dịch bệnh mới của vi khuẩn lây nhiễm trong hệ thống nuôi (Bartie et al., 2023; Erickson et al., 2023).

Gần đây, sự xuất hiện bệnh lở loét trên cá da trơn ở nhiều khu vực Châu Á và trên cá tra nói riêng làm gia tăng mối lo ngại về một dịch bệnh mới lan rộng. Bệnh gây chết hàng loạt ở cá tra tại ĐBSCL đã trở thành một trong những vấn đề nổi bật nhất và thu hút nhiều sự chú ý. Đặc điểm chung của bệnh lở loét cá da trơn là tổn thương ăn sâu gây hoại tử trên da và cơ của cá bệnh. Da cá là loại mô linh hoạt, đóng vai trò là tuyến phòng thủ đầu tiên chống lại bệnh tật và là rào cản chống lại các chất ô nhiễm trong nước (Sadi & Yoga, 2021). Các vết loét là nơi để các sinh vật gây bệnh xâm chiếm vùng da bị tổn thương (Noga, 2000). Những tổn thương này đã đặt ra một thách thức đáng kể cho cả quần thể cá nuôi và cá hoang dã khi bị nhiễm bệnh (Sindermann, 1990).

Hiện nay, chưa có bất kỳ thông tin về tác nhân gây bệnh lở loét nào trên cá tra ở ĐBSCL gây khó khăn trong công tác chẩn đoán để dự phòng và điều trị bệnh. Nghiên cứu cho thấy loét da có liên quan đến nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm các yếu tố môi trường như thiếu oxy, mất cân bằng độ pH, biến động nội tiết tố, nhiệt độ khắc nghiệt, tiếp xúc với bức xạ tia cực tím, chấn thương vật lý và do các bệnh truyền nhiễm (Noga, 2000). Bên cạnh đó, nguyên

nhân có thể gây ra tình trạng này là hội chứng lở loét trên cá nước ngọt (EUS, Epizootic Ulcer Syndrome) do đa tác nhân vi khuẩn, nấm, virus, ký sinh trùng gây ra (Kar & Aurobindo, 2021) và nhóm *Vibrio* spp. nước ngọt lây nhiễm trên cá hay cụ thể hơn là *V. mimicus*. Tuy nhiên, nếu chỉ chẩn đoán thông qua dấu hiệu bệnh lý bên ngoài, bệnh rất dễ nhầm lẫn với hội chứng EUS. Vi khuẩn này được tìm thấy trong hầu hết trên loài thủy sản được nuôi thâm canh, từ cá nước ngọt, lợ, mặn và cả ở trên tôm nuôi nước ngọt và lợ (Guardiola-Avila et al., 2015; Guardiola-Avila et al., 2016; Raja et al., 2017; Nilavan et al., 2021; Elgendy et al., 2022; Jiang et al., 2022). Bên cạnh đó, vi khuẩn *V. mimicus* từ lâu đã được ghi nhận là tác nhân gây chết cấp tính đặc biệt nghiêm trọng trên nhóm cá da trơn nước ngọt nuôi thâm canh bao gồm họ cá da trơn (Geng et al., 2014; Zhang et al., 2014; Li et al., 2019; Feng et al., 2023).

Vi vậy, việc xác định tác nhân gây bệnh lở loét trên cá tra nuôi ở ĐBSCL là rất quan trọng. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin chi tiết bệnh mới nổi nhằm tạo tiền đề cho các nghiên cứu trong tương lai để kiểm soát bệnh này.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thu mẫu và phân lập vi khuẩn

Cá bệnh kích thước từ 200 đến 700 g, ở giai đoạn nuôi từ 3 – 6 tháng, được thu tại 10 ao nuôi thâm canh (mật độ 80 – 120 con/m<sup>2</sup>) thuộc các tỉnh An Giang (4 ao), Cần Thơ (1 ao) và Đồng Tháp (5 ao) từ tháng 4/2023 đến tháng 6/2023. Mỗi ao thu 4 cá bệnh có dấu hiệu điển hình của bệnh lở loét và 2 mẫu cá khoẻ để làm đối chứng. Các mẫu cá được thu sống và gây mê, phân lập kiểm tra các mầm bệnh trực tiếp tại ao. Dấu hiệu bệnh lý bên trong và bên ngoài được ghi nhận vào phiếu thu mẫu.

Vi khuẩn được phân lập từ vết loét da, cơ, gan và thận bằng phương pháp cấy ria trên môi trường TSA (Tryptone soya agar, Merck, Đức), TCBS (Thiosulfate citrate bile salts sucrose, Merck, Đức), GSP (Pseudomonas Aeromonas Selective Agar Base, Merck, Đức) và ủ 24 giờ ở 28°C. Các khuẩn lạc nằm trên đường cấy và tương đồng với nhau về hình thái giữa các mẫu cá bệnh sẽ được chọn tách rơng thuần và được bảo quản ở trong glycerol (25%) ở -80°C.

### 2.2. Định danh vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn sau khi phân lập được kiểm tra một số đặc điểm hình thái và sinh hóa như nhuộm Gram, catalase, oxidase, phản ứng oxy hóa và lên men đường (phản ứng O/F). Các chỉ tiêu trên được

phân tích theo qui trình hướng dẫn trong Sổ tay Phòng thí nghiệm Ứng dụng Vi sinh của Benson (Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual, Brown & Smith, 2014) và Buller (2014). Ngoài ra, nghiên cứu sử dụng bộ kit thương mại API 20E (BioMérieux, Pháp) để định danh vi khuẩn. Để xác định chính xác đến loài các chủng vi khuẩn phân lập, phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S rRNA bằng cặp mồi 27F được sử dụng: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Weisburg et al., 1991) và để tái định danh vi khuẩn trước/sau cảm nhiễm cặp mồi Vm.sodB-F: 5'-CATTCGGTTCTTTCGCTGAT-3' và Vm.sodB-R2: 5'-GAAGTGTTAGTGATTGCTAGAGAT-3' (Tarr et al., 2007) cũng được sử dụng.

DNA của vi khuẩn trong tất cả các phản ứng đều được tách chiết bằng phương pháp đun sôi sử dụng AccuRive Bacterial DNA Preparation Kit (Kt-Biotech, Việt Nam) và quy trình ly trích được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng PCR được thực hiện với thể tích 25  $\mu$ L, bao gồm 12.5  $\mu$ L Go-Taq® Green Master Mix 2X (Promega), 2  $\mu$ L mỗi loại mồi xuôi và mồi ngược (10 pmol), 2  $\mu$ L DNA vi khuẩn và 6.5  $\mu$ L nước cất hai lần. Chu kỳ thực hiện phản ứng PCR gồm: biến tính ban đầu ở 95°C, 2 phút, sau đó thực hiện 30 chu kỳ, gồm: biến tính ở 95°C, 1 phút, gắn mồi 27F/1492R là 54°C và Vm.sodB là 57°C, 1 phút và kéo dài ở 72°C, 1 phút 30 giây và kéo dài ở 72°C trong thời gian 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% sử dụng đệm TBE 1X trong 60 phút ở điện áp 60V và quan sát kết quả bằng Gel Red 10.000X. Sản phẩm PCR của cặp mồi 16S rRNA có kích thước 1.500 bp và Vm.sodB có kích thước 121 bp. Sản phẩm PCR của đoạn gen 16S rRNA được gửi giải trình tự bởi Công ty Cổ phần Phù Sa Genomics (Việt Nam). Kết quả giải trình tự nucleotide của đoạn gen 16S rRNA được phân tích bằng phần mềm BioEdit 7.7 và so sánh mức độ tương đồng với trình tự đã được công bố trên NCBI (National Center for Biotechnology Information) bằng chương trình BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Cây phả hệ giữa các chủng vi khuẩn phân lập trên cá tra với các chủng vi khuẩn tham khảo được xây dựng bằng phần mềm MEGA 11.0 (Yu et al., 2020) sử dụng thuật toán Maximum Likelihood với giá trị bootstrap 1.000 lần lặp lại.

### 2.3. Thí nghiệm cảm nhiễm

#### 2.3.1. Cá thí nghiệm

Trước khi bố trí thí nghiệm, cá tra khỏe mạnh (trọng lượng trung bình 30 $\pm$ 0,5 g) được thuần dưỡng

trong bể 1 m<sup>3</sup> ở nhiệt độ 28-30°C trong 1-2 tuần. Trước khi gây nhiễm, cá được chọn ngẫu nhiên (10 con) để kiểm tra vi khuẩn, ký sinh trùng và nấm nhằm đảm bảo cá khỏe, sạch bệnh. Quy trình kiểm tra vi sinh vật được thực hiện theo các tài liệu hướng dẫn của Noga (2010), Frerichs & Millar (1993).

#### 2.3.2. Chuẩn bị vi khuẩn gây cảm nhiễm

Dựa trên kết quả thí nghiệm thăm dò (dữ liệu không được trình bày trong bài báo này), ba chủng CT5, NV9 và VH120 phân lập từ cá tra bệnh lở loét được chọn cho thí nghiệm cảm nhiễm. Đầu tiên, vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường TSB (Tryptone Soy Broth, Merck, Đức) trên máy lắc ở 28°C. Dịch tăng sinh sau 24 giờ được ly tâm ở vận tốc 4.500 vòng/phút ở 25°C trong thời gian 10 phút. Sau đó, sinh khối vi khuẩn được rửa lại 3 lần với nước muối sinh lý tiệt trùng (NaCl 0,85%). Cuối cùng, mật số vi khuẩn được xác định ở bước sóng 610 nm (OD<sub>610</sub> = 0,8), tương đương mật số vi khuẩn là 10<sup>9</sup> CFU/mL (Brown & Smith, 2014).

#### 2.3.3. Phương pháp cảm nhiễm

Phương pháp cảm nhiễm ngâm được thực hiện dựa trên nghiên cứu của Zhang et al. (2014) với thời gian phơi nhiễm 60 phút. Ở nghiệm thức đối chứng, cá được phơi nhiễm với nước muối sinh lý tiệt trùng được bổ sung vào bể. Sau 60 phút phơi nhiễm, nước trong bể được thay mới. Tất cả các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 10 cá/bể. Hệ thống thí nghiệm được sục khí và cho cá ăn trong thời gian gây cảm nhiễm.

**Bảng 1. Thông tin vi khuẩn cảm nhiễm**

Nghiệm thức	Chủng vi khuẩn	Mật độ (CFU/mL)	Nồng độ cảm nhiễm (CFU/mL)
CT5-3			6,6 $\times$ 10 <sup>3</sup>
CT5-4	<i>V. mimicus</i>	6,6 $\times$ 10 <sup>9</sup>	6,6 $\times$ 10 <sup>4</sup>
CT5-5	CT5		6,6 $\times$ 10 <sup>5</sup>
CT5-6			6,6 $\times$ 10 <sup>6</sup>
NV9-3			4,6 $\times$ 10 <sup>3</sup>
NV9-4	<i>V. mimicus</i>	4,6 $\times$ 10 <sup>9</sup>	4,6 $\times$ 10 <sup>4</sup>
NV9-5	NV9		4,6 $\times$ 10 <sup>5</sup>
NV9-6			4,6 $\times$ 10 <sup>6</sup>
VH120-2			5,0 $\times$ 10 <sup>2</sup>
VH120-3	<i>V. mimicus</i>	5,0 $\times$ 10 <sup>8</sup>	5,0 $\times$ 10 <sup>3</sup>
VH120-4	VH120		5,0 $\times$ 10 <sup>4</sup>
VH120-5			5,0 $\times$ 10 <sup>5</sup>
Đối chứng	Bổ sung 10 mL NaCl 0,85%		

Cá sau khi gây cảm nhiễm được theo dõi trong 14 ngày. Cá chết và các dấu hiệu bệnh lý được ghi nhận trong quá trình thí nghiệm và tái phân lập trên

môi trường TSA. Sau khi kết thúc thí nghiệm, giá trị LD<sub>50</sub> (lethal dose) được xác định theo phương pháp của Reed & Muench (1938). Ngoài ra, trong thí nghiệm cảm nhiễm, nhiệt độ nước, độ pH và lượng oxy hòa tan (Dissolve oxygen, DO) được thu thập hai lần mỗi ngày (lúc 8 giờ sáng và 3 giờ chiều) bằng nhiệt kế và đồng hồ đo kỹ thuật số Oxy-Guard cầm tay. Bên cạnh đó, nồng độ nitơ amoniac tổng (TAN, total ammonia nitrogen) và nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) được theo dõi hàng ngày bằng bộ test-kit (Sera, Đức).

#### 2.4. Xử lý số liệu

Các số liệu cảm nhiễm được phân tích bằng chương trình Microsoft Excel 2020.

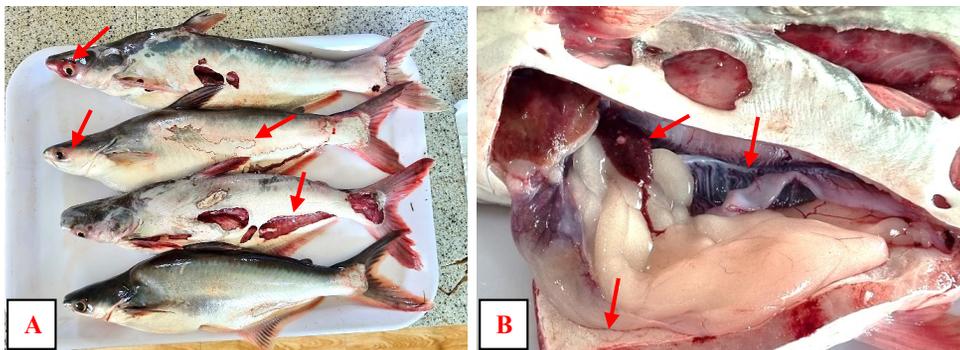
### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Dấu hiệu bệnh lý cá tra bệnh lở loét

Bệnh lở loét trên cá tra là một bệnh mới nổi và phổ biến từ những năm 2020. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào đề cập đến bệnh này trên cá da trơn nuôi tại ĐBSCL đặc biệt là đối với loài cá tra. Kết quả nghiên cứu cho thấy, dấu hiệu bệnh lý điển hình của cá tra khi nhiễm bệnh lở loét là da có các dấu hiệu hoại tử lớp biểu bì da, một số trường hợp vết loét ăn sâu, từng phần cơ bị hoại tử mềm nhũn và một vài trường hợp cá bệnh có dấu hiệu xuất huyết,

phù mắt đi kèm (Hình 1A). Một đặc điểm đặc trưng khác của bệnh này là cá có mùi hôi tanh nồng và da cá tiết nhiều nhớt. Mùi tanh của cá càng có thể cảm nhận rõ ràng khi vết loét càng ăn sâu và khi giải phẫu xoang bụng cá. Bên trong nội quan cá bệnh ghi nhận gan, thận và tỷ tạng sưng to, các mạch máu màng bụng phình to nổi rõ, một vài trường hợp có ghi nhận trong xoang bụng có dịch màu hồng tương tự bệnh phù mắt xuất huyết do *A. hydrophila* (Dung et al., 2008; Ly et al., 2009) (Hình 1B).

Đặc điểm bệnh lý của cá bệnh lở loét được ghi nhận ở các mức độ khác nhau, vị trí lườn bụng, phía trên vi hậu môn và dưới cơ quan đường bên (Hình 1A). Dấu hiệu là xuất huyết điểm nhỏ rải rác nằm dọc vị trí này và bong tróc nhẹ lớp biểu bì da. Sau đó, tổn thương sẽ lan rộng ra ở các vị trí khác và dần ăn sâu vào trong cơ, các điểm xuất huyết cũng trải rộng xung quanh các vết lở loét. Một số mẫu cá được ghi nhận có hiện tượng mung mù xung quanh vị trí hoại tử cơ. Bệnh được ghi nhận bùng phát mạnh vào các tháng mùa khô ở ĐBSCL kéo dài từ tháng 2 đến tháng 5 hằng năm. Đây là thời điểm có nền nhiệt độ cao nhất trong năm tại ĐBSCL, yếu tố nhiệt độ và chất lượng nước kém là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến khả năng vi khuẩn *Vibrio* spp. bùng phát mạnh (Elgendy et al., 2022).



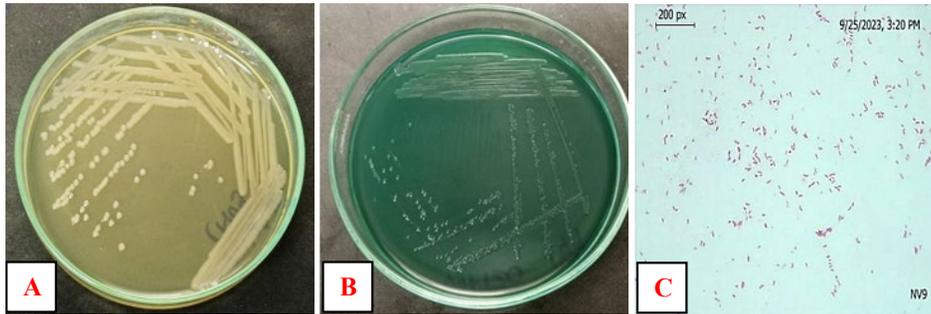
Hình 1. Dấu hiệu cá tra bệnh lở loét thu mẫu ngoài ao nuôi

A. Vết loét ở nhiều mức độ bệnh khác nhau trên da cá tra; B. Gan, thận và tỷ tạng trương to, xoang bụng có dịch

#### 3.2. Đặc điểm hình thái và sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập

Tổng cộng ba chủng vi khuẩn được tuyển chọn đại diện từ các chủng phân lập trên cá tra bệnh lở loét ở các ao nuôi đại diện ở Cần Thơ, An Giang và Đồng Tháp. Tất cả các chủng vi khuẩn phân lập đều thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, hình que cong, có kết quả dương tính với các xét nghiệm O/F, catalase

và oxidase (Bảng 1, Hình 2). Đặc điểm chung của các chủng vi khuẩn này đều phát triển tốt trên môi trường TSA với có khuẩn lạc hình tròn, nhẵn bóng, viền trong, nhô cao khỏi mặt thạch, màu trắng ngà vàng và đạt kích thước 2 mm đường kính sau 24 giờ (Hình 2A). Ngoài ra, trên môi trường TCBS, ba chủng CT5, NV9 và VH120 phát triển khuẩn lạc xanh lá nhạt, sau 24 giờ đường kính khuẩn lạc dao động từ 1 đến 1,5 mm (Hình 2B).



**Hình 2. Đặc điểm của *V. mimicus* NV9 phân lập từ cá tra bị bệnh lở loét**

A: khuẩn lạc phát triển mạnh có màu trắng ngả vàng trên TSA sau 24 giờ, B: khuẩn lạc có màu xanh lá nhạt khi mọc trên TCBS sau 24 giờ, C: vi khuẩn hình que cong và bắt màu hồng đỏ khi nhuộm Gram (X1000).

**Bảng 2. Đặc điểm hình thái, sinh hóa của các chủng vi khuẩn *V. mimicus* phân lập được**

Các chỉ tiêu	<i>V. mimicus</i> ATCC 33653 (Buller, 2014)	Chủng vi khuẩn phân lập		
		CT5 <sup>1</sup>	NV9 <sup>2</sup>	VH120 <sup>3</sup>
Gram	-	-	-	-
Đặc điểm khuẩn lạc	Tròn	Tròn	Tròn	Tròn
Hình dạng tế bào	Que cong	Que cong	Que cong	Que cong
Đường kính khuẩn lạc trên TSA (mm)	1,5	2	2	2
Đường kính khuẩn lạc trên TCBS (mm)	-	1 – 1,5	1 – 1,5	1 – 1,5
Di động	+	+	+	+
Màu sắc khuẩn lạc trên TSA	Trắng ngả vàng	Trắng ngả vàng	Trắng ngả vàng	Trắng ngả vàng
Màu sắc khuẩn lạc trên TCBS	Xanh lá	Xanh lá	Xanh lá	Xanh lá
GSP	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Phản ứng O/F	-/+	-/+	-/+	-/+
ONPG	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
URE	-	-	-	-
TDA	+	+	+	+
IND	+	+	+	+
VP	-	+	+	+
GEL	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+
INO	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-
SAC	-	-	-	-
MEL	-	-	-	-
AMY	-	-	-	-
ARA	-	-	-	-

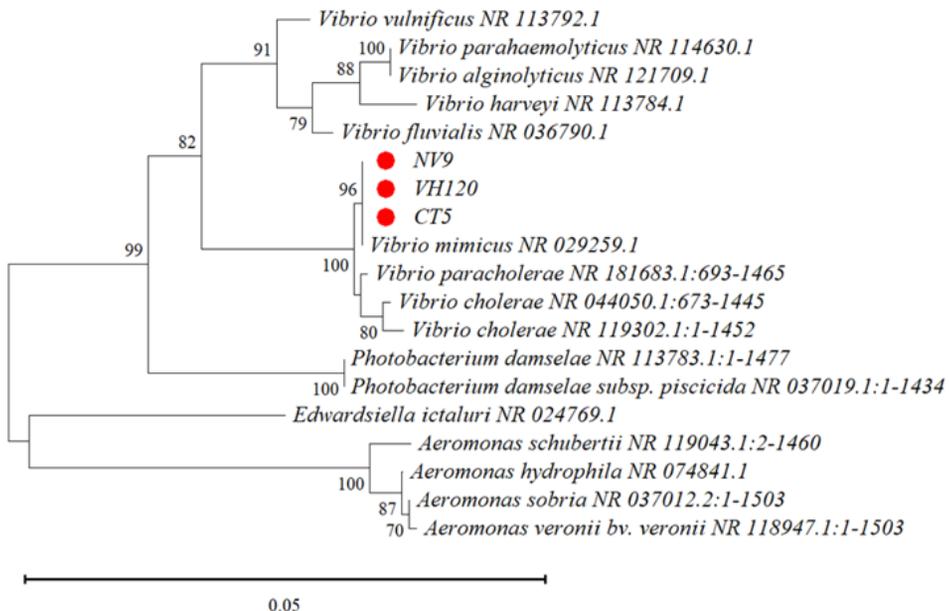
Ghi chú: (+): dương tính, (-): âm tính. Phân lập tại: (1) Cần Thơ, (2) An Giang và (3) Đồng Tháp.

Kết quả định danh vi khuẩn bằng bộ kit API 20E cho thấy có tương đồng cao về các đặc điểm hình thái và sinh hóa giữa các chủng được lựa chọn. Tất cả các chủng phân lập đều phản ứng dương tính, ngoại trừ các chỉ tiêu H<sub>2</sub>S, URE, INO, AMY, MEL, SAC, RHA, SOR và ADH cho kết quả âm tính (Bảng 1). Nhìn chung, các đặc điểm hình thái và sinh hóa của ba chủng vi khuẩn phân lập tương tự với các đặc điểm của vi khuẩn *V. mimicus* đã được mô tả trước đây (Buller, 2014; Zhang et al., 2014; Raja et al., 2017; Li et al., 2019; Nilavan et al., 2021; Elgendy et al., 2022). Tuy nhiên, cần lưu ý *V. mimicus* và *V. cholerae* là những loài có liên quan chặt chẽ với nhau, trước đây loài *V. mimicus* được xem là một nhánh phụ của loài *V. cholerae* (Davis et al., 1981; Zhang et al., 2014; Yu et al., 2020). Theo Davis et al. (1981) và Desmarchelier & Reichelt (1984), về mặt sinh hóa, hai loài này chủ yếu được phân biệt bằng quá trình lên men sucrose. Trong nghiên cứu này, ba chủng *V. mimicus* phân lập đều không thể chuyển hóa sucrose trong điều kiện hiếu khí. Dựa trên kết quả định danh thông qua các chỉ tiêu sinh lý hoá cơ bản, các chủng vi khuẩn phân lập trên cá tra bệnh trong nghiên cứu này ban đầu được xác định là *V. mimicus*.

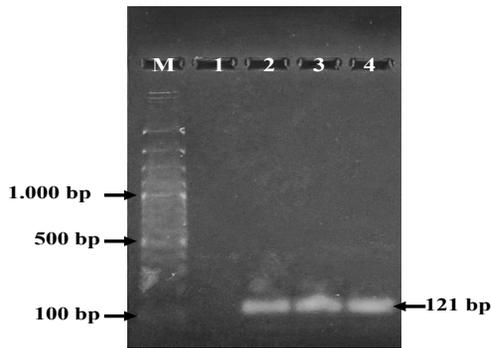
### 3.3. Kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rRNA

Kết quả giải trình tự đoạn gen 16S rRNA cho thấy ba chủng CT5, NV9, VH120 có độ tương đồng cao nhất với vi khuẩn *V. mimicus* là 99,87% với chiều dài lần lượt là 1544, 1547 và 1539 bp. Cây phát sinh chủng loại đã phân nhóm các chủng CT5, NV9 và VH120 cùng với *V. mimicus* trong một nhánh, trong khi các chủng tham chiếu *V. cholerae* được xếp vào một nhánh riêng biệt (Hình 3). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu đã công bố của Guardiola-Avila et al. (2016), Guardiola-Avila et al. (2021) và Xiao et al. (2022) khi sử dụng phương pháp giải trình tự 16S rRNA để định danh loài *V. mimicus* trên thực phẩm và trong môi trường nước.

Kết quả sử dụng mỗi đặc hiệu Vm.sodB cũng đã cho thấy khả năng phát hiện ra vi khuẩn *V. mimicus* bằng phương pháp PCR truyền thống, khi ba chủng vi khuẩn NV9, VH120, CT5 đều cho ra kết quả dương tính ở vạch 121 bp (Hình 4). Đoạn gen *sodB* được Tarr et al. (2007) lựa chọn để thiết kế mỗi đặc hiệu cho *V. cholerae*, *V. mimicus* trong phương pháp PCR đa môi. Trong đó, sản phẩm khuếch đại với *V. cholerae* sẽ là 248 bp và *V. mimicus* là 121 bp (Tarr et al., 2007). Qua đó, cho thấy khẳng định vi khuẩn *V. mimicus* là loài được phân lập trên cá tra bệnh lõ loét.



Hình 3. Cây phát sinh loài thể hiện mối quan hệ giữa các chủng phân lập và các chủng tham chiếu



**Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR định danh vi khuẩn *V. mimicus* bằng môi đặc hiệu *Vm.sodB***

*M: thang GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo scientific, Hoa Kỳ), Giếng 1: đối chứng âm, Giếng 2: chủng CT5, Giếng 3: chủng NV9, Giếng 4: chủng VH120.*

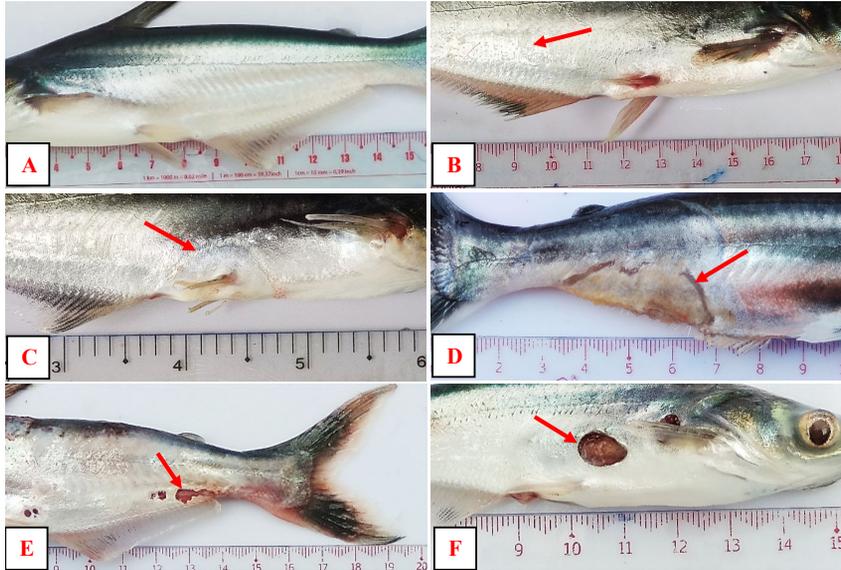
### 3.4. Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm

Kết quả cảm nhiễm cho thấy ba chủng NV9, VH120 và CT5 có độc lực cao với tỷ lệ tử vong lần lượt là 100%, 100% và 60% sau 14 ngày gây cảm nhiễm. Các dấu hiệu ở cá gây nhiễm bởi ba chủng phân lập giống như các dấu hiệu quan sát thấy ở cá tra nhiễm bệnh tự nhiên tại các ao nuôi đã thu mẫu (Hình 5). Các triệu chứng lâm sàng rõ ràng nhất là các vết loét có hình dạng đều đặn với ranh giới rõ ràng trên da cá (Hình 5C - F). Bên trong, xuất huyết nghiêm trọng trong xoang bụng và các nội quan bao gồm gan, túi mật, tỷ tạng và thận cũng được ghi nhận có dấu hiệu sưng to ở cá bị bệnh. Ngoài ra, kết quả tái phân lập và định danh vi khuẩn sau cảm nhiễm cho thấy ba chủng vi khuẩn sau cảm nhiễm đều được phân lập lại từ vết loét da, gan và thận của cá tra sau cảm nhiễm và có các đặc điểm hình thái, sinh hóa giống với vi khuẩn trước khi lây nhiễm. Trong khi đó, cá ở nhóm đối chứng không có dấu hiệu loét da hoặc tử vong. Bên cạnh đó, trong suốt quá trình thí nghiệm, chất lượng nước trong tất cả các bể cá đều đáp ứng mức khuyến nghị (QCVN 02-20:2014/BNNPTNT, QCVN 08-MT:2015/BTNMT, Huynh et al., 2016) mặc dù có mức nitrite tăng nhẹ.

Kết quả quan sát cá cảm nhiễm từ ngày 0 đến ngày 1 cho thấy cá hoạt động, bơi lội và phản ứng tốt với thức ăn. Tuy nhiên, từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 4, các dấu hiệu nhiễm bệnh bắt đầu xuất hiện như nước đục, tiết dịch nhày, phản ứng ăn kém, bơi chậm, có hiện tượng mòn đuôi, có vết bầm tím trên da (Hình 5B - C). Ở tất cả các nghiệm thức từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 7, độ đục của nước tăng đáng kể, dẫn đến tỷ lệ tử vong tăng lên. Cá bơi chậm, một số cá chìm dưới đáy bể có các mảng hoại tử, xuất

huyết (Hình 5D). Từ ngày thứ 8 đến ngày thứ 10, tỷ lệ tử vong và độ đục của nước tiếp tục gia tăng với các mảng hoại tử, loét, xuất huyết, thận, gan và tích tụ dịch lỏng trong bụng (Hình 5E). Từ ngày thứ 12, ba chủng vi khuẩn phân lập đều biểu hiện các vết loét. Nghiên cứu cũng nhận thấy các dấu hiệu bệnh lý đặc trưng đều biểu hiện ở ngoài da, bên trong nội quan hầu hết các mẫu cá chỉ ghi nhận các dấu hiệu như có dịch, trương nội quan. Dễ nhầm lẫn với dấu hiệu bệnh lý của các mầm bệnh khác lấy nhiễm trên cá tra như trương bóng hơi hoặc xuất huyết phù mắt. Ngoài ra, cá khi thu mẫu tái phân lập có mùi tanh nồng ở cả ngoài da và bên trong nội quan. Đây cũng là một dấu hiệu có thể được cho là đặc trưng của vi khuẩn *V. mimicus* lây nhiễm trên cá tra.

Đặc điểm gây bệnh của vi khuẩn *V. mimicus* có thể được quan sát thông qua các biểu đồ tỉ lệ chết tích lũy trong thí nghiệm cảm nhiễm. Vi khuẩn *V. mimicus* có khả năng gây chết cấp tính trên cá tra bị lây nhiễm, mặc dù thời gian sinh bệnh lý cần thiết để thể hiện ra dấu hiệu đặc trưng của bệnh khi lây nhiễm lên cá tra có thể kéo dài đến 10 ngày. Giá trị LD<sub>50</sub> của ba chủng vi khuẩn CT5, NV9 và VH120 được xác định sau khi cảm nhiễm lần lượt là 1,66×10<sup>4</sup> CFU/mL, 3,98×10<sup>4</sup> CFU/mL và 1,58×10<sup>3</sup> CFU/mL. Trong khi đó, ở các nghiệm thức đối chứng không ghi nhận cá chết hoặc dấu hiệu bất thường. Tỷ lệ chết tích lũy của tất cả các nghiệm thức trong thử nghiệm cảm nhiễm được trình bày trong Hình 6. Giá trị LD<sub>50</sub> của 3 chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này đều thấp hơn các nghiên cứu trước đó của với LD<sub>50</sub> của *V. mimicus* cảm nhiễm trên cá da trơn vàng (*Pelteobagrus fulvidraco*) là 3,39×10<sup>6</sup> CFU/cá (Zhang et al., 2014) và trên cá rô phi đen (*Oreochromis niloticus*) là 8,2×10<sup>5</sup> CFU/mL (Elgendy et al., 2022) và trên cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) 3,42×10<sup>5</sup> CFU/cá (Li et al., 2019). Kết quả này cho thấy các chủng *V. mimicus* phân lập có độc lực cao khi lây nhiễm trên cá tra (*P. hypophthalmus*). Nghiên cứu của Geng et al. (2014) cũng ghi nhận được vi khuẩn *V. mimicus* gây độc lực cao trên cá da trơn Zhengechuan (*Silurus sellatovi meridionalis*, Chen ♂ × *Silurus asotus* ♀), giá trị LD<sub>50</sub> dao động từ 4,8×10<sup>3</sup> đến 2,0×10<sup>4</sup> CFU/cá. Bên cạnh đó, kết quả cho thấy rằng *V. mimicus* có thể trực tiếp gây nhiễm trùng qua da ở cá khỏe mạnh. Do đó, các nghiên cứu về cơ chế gây bệnh, các yếu tố liên quan đến khả năng gây bệnh và các biện pháp kiểm soát vi khuẩn *V. mimicus* cần được thực hiện trong tương lai. Như vậy, kết quả cảm nhiễm cho thấy các chủng CT5, NV9 và VH120 được chứng minh là gây bệnh cho cá tra, bằng chứng là chúng có khả năng gây ra các dấu hiệu bệnh lý tương tự với cá tra bệnh lở loét được thu ở ao nuôi thực địa (Hình 1).



**Hình 5. Dấu hiệu bệnh lý quan sát trên da cá tra cảm nhiễm với các chủng vi khuẩn *V. mimicus***

A. Da cá tra khỏe với màu sắc sáng, đều màu, B. Da cá cảm nhiễm có dấu hiệu mất nhớt và bị ăn bong tróc lớp biểu bì (mũi tên), C. Màng da bị bong tróc có dấu hiệu lan rộng và có viền xung quanh (mũi tên), D. Các mảng hoại tử da đã có ranh giới rõ ràng (mũi tên), E. Vùng hoại tử có viền dạng răng cưa mở rộng và ăn sâu đến cơ (mũi tên), F. Hình thành các ổ loét sâu vào trong cơ và nội quan với phần viền tròn rõ ràng (mũi tên).

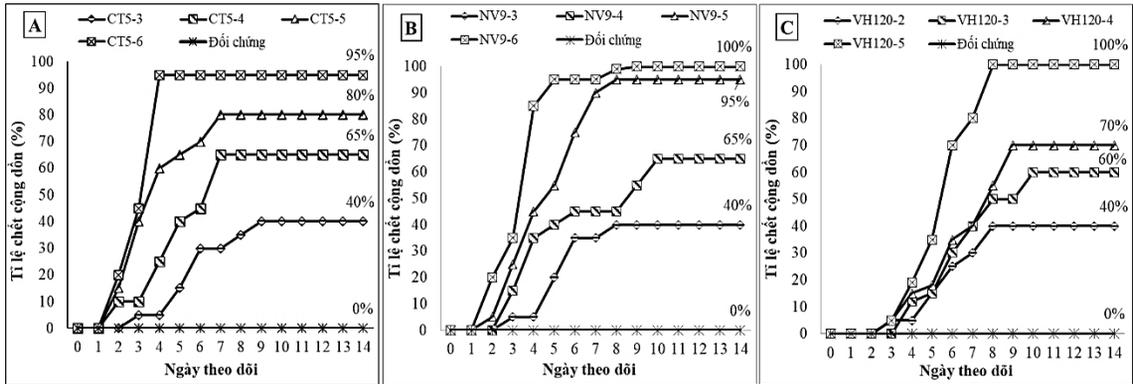
Nhìn chung, các dấu hiệu bệnh lý của cá tra bệnh lở loét trong nghiên cứu này tương tự bệnh do vi khuẩn *V. mimicus* trên các loài cá khác được báo cáo (Li et al., 2019; Feng et al., 2023). Nghiên cứu của Geng et al. (2014) cho thấy bệnh loét da do vi khuẩn *V. mimicus* trên cá da trơn nước ngọt ở Trung Quốc, bao gồm: cá da trơn vàng (*P. fulvidraco*), cá da trơn miền Nam (*S. sellatovi meridionalis*, Chen) và cá da trơn Zhengchuan (*S. sellatovi meridionalis*, Chen ♂ × *S. asotus* ♀) có các dấu hiệu bệnh lý như cá bơi lội lờ đờ, chán ăn, da đổi màu, loét da chảy máu, chảy máu, sưng tấy và hoại tử ở lá lách, thận và gan. Ngoài ra, nghiên cứu của Geng et al. (2014) cũng cho thấy được khả năng lây nhiễm chéo của vi khuẩn *V. mimicus* giữa các vật chủ là các loài cá da trơn được nuôi tại Trung Quốc. Tương tự, nghiên cứu của Zhang et al. (2014) cũng cho thấy cá da trơn vàng (*P. fulvidraco*) nhiễm bệnh do vi khuẩn *V. mimicus* ở tỉnh Quảng Đông và Quảng Tây của Trung Quốc có các triệu chứng lâm sàng rõ ràng nhất của bệnh là các vết loét có hình dạng đều đặn với ranh giới rõ ràng trên da cá. Ngoài ra, xuất huyết nghiêm trọng trong thành xoang bụng và sự phì đại của các cơ quan bao gồm gan, túi mật, lá lách và thận cũng được tìm thấy ở cá bị bệnh. Có thể thấy, dấu hiệu bệnh lý lở loét đều có sự tương đồng giữa các loài cá da trơn bị nhiễm vi khuẩn *V. mimicus*, với các vùng da loét hoại tử ăn sâu vào cơ và có viền rõ. Vết loét trên cá tra (*P. hypophthalmus*) có thể ăn sâu vào

cơ nếu phơi nhiễm với mầm bệnh trong thời gian dài. Riêng đối với nhóm cá có vây như cá rô phi đen (*O. niloticus*) dấu hiệu bệnh lý khi nhiễm bệnh có sự khác biệt với nhóm cá da trơn. Đặc điểm đặc trưng bao gồm da sẫm màu, xuất huyết theo vùng lớn bên ngoài cơ thể, lở niêm, hậu môn, xung quanh miệng, bong tróc nhẹ lớp vảy và da (Elgendy et al., 2022).

Sự khác biệt về dấu hiệu bệnh lý này là do có sự khác biệt về thành phần collagen có trong cấu trúc da giữa nhóm cá vây và cá da trơn. Collagen có trong da cá là collagen loại I giàu glycine và proline đóng vai trò quan trọng ngăn ngừa nhiễm trùng và tổn thương (Sadi & Yoga, 2021). Theo nghiên cứu của Feng et al. (2023) sự loét da do vi khuẩn *V. mimicus* có thể tiết ra enzyme collagenase phân hủy collagen, quá trình này sẽ chuyển hoá collagen loại I trên da cá thành hỗn hợp collagen loại I và III và khi MMP-9 và MMP-13 đến để thực hiện chức năng tái tạo mô vô tình làm cho vi khuẩn đi sâu vào trong cơ làm quá trình lây nhiễm trầm trọng hơn. Khi có sự tác động của vi khuẩn *V. mimicus*, hệ miễn dịch trên da bị kích thích quá mức tạo nên hiện tượng cơn bão cytokine trong da và cơ cá, với IL-1b, IL-6, chemokine, MMP-9 và MMP-13 đóng vai trò chủ yếu (Feng et al., 2023). Yếu tố ban đầu này kéo theo hàng loạt phản ứng dây chuyền nối tiếp sau đó bao gồm gây viêm, hoại tử da cơ, mở rộng vùng tổn thương và cuối cùng cá chết do sốc nhiễm khuẩn. Do tác động của hiện tượng cơn bão cytokine nên cá

nhễm bệnh có khả năng chết sốc rất nhanh trước khi các tổn thương lan rộng trên da. Qua đó có thể giải thích được mùi hôi tanh của cá bệnh là do sự phân

huỷ collagen trên da cá khi nhiễm vi khuẩn *V. mimicus*.



Hình 6. Kết quả cảm nhiễm xác định giá trị LD<sub>50</sub> của ba chủng vi khuẩn phân lập

A: cảm nhiễm chủng CTS5; B: cảm nhiễm chủng NV9; C: cảm nhiễm chủng VH120

Bên cạnh đó, trong thí nghiệm cảm nhiễm xác định tác nhân gây bệnh, các mẫu cá có dấu hiệu bệnh lý được tái phân lập trên hai môi trường TSA và TCBS đều cho kết quả dương tính với vi khuẩn *V. mimicus*. Vậy, vi khuẩn *V. mimicus* đã thoả mãn được định đề Koch's ở cả 04 yếu tố là phân lập, nuôi cấy, cảm nhiễm và tái định danh. Do đó, ta có thể xác định được *V. mimicus* là tác nhân gây bệnh lở loét trên cá tra nuôi thâm canh.

#### 4. KẾT LUẬN

Bệnh lở loét trên cá tra (*P. hypophthalmus*) ở ĐBSCL là một bệnh mới nổi. Dựa trên các xét nghiệm hình thái, sinh hóa và giải trình tự đoạn gen

16S rRNA, nghiên cứu đã xác định vi khuẩn được phân lập trên cá tra bệnh lở loét là *V. mimicus*. Thí nghiệm cảm nhiễm đã đánh giá được vi khuẩn *V. mimicus* có khả năng gây chết cao với giá trị LD<sub>50</sub> dao động từ 10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup> CFU/mL và nghiên cứu đã thoả mãn được định đề Koch's của nhóm vi khuẩn này gây bệnh lở loét trên cá tra. Tuy nhiên, cần có nhiều nghiên cứu hơn nữa bao gồm mô bệnh học, dịch tễ học và phát hiện các gen độc lực để đánh giá toàn diện hơn về khả năng gây bệnh của mầm bệnh mới nổi này để đưa ra được phương pháp phòng trị bệnh phù hợp.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO (REFERENCES)

Brown, A., & Smith, H. (2014). *Benson's Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology, Short Version* (14<sup>th</sup> ed.). McGraw-Hill Education.

Buller, N. B. (2014). *Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual* (20<sup>nd</sup> ed.). Cabi publishing.

Bartie, K. L., Ngo, T. P. H., Bekaert, M., Hoang Oanh, D. T., Hoare, R., Adams, A., & Desbois, A. P. (2023). *Aeromonas hydrophila* ST251 and *Aeromonas dhakensis* are major emerging pathogens of striped catfish in Vietnam. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1067235. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1067235>

Crumlish, M., Thanh, P. C., Koesling, J., Tung, V. T., & Gravningen, K. (2010). Experimental challenge studies in Vietnamese catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage), exposed to *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*, 33(9),

717–722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01173.x>

Datta, S. N., & Ansal, M. D. (2020). Induced breeding of Asian striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* under farmer participatory mode in Punjab. *Journal of Krishi Vigyan*, 9(si), 202–208. <http://dx.doi.org/10.5958/2349-4433.2020.00103.x>

Davis, B. R., Fanning, G. R., Madden, J. M., Steigerwalt, A. G., Bradford Jr, H. B., Smith Jr, H. L., & Brenner, D. J. (1981). Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 14(6), 631–639. <https://doi.org/10.1128/jcm.14.6.631-639.1981>

Desmarchelier, P. M., & Reichelt, J. L. (1984). A phenotypic and genetic study of sucrose

- nonfermenting strains of *Vibrio mimicus* and *Vibrio cholerae*. *Current Microbiology*, 10, 41-47. <https://doi.org/10.1007/BF01576046>
- Dung, T. T., Ngoc, N. T. N., Thinh, N. Q., Tuan, N. A., Shinn, A., & Crumlish, M. (2008). Common diseases of *Pangasius catfish* farmed in Vietnam (in Vietnamese). <https://www.globalseafood.org/advocate/common-diseases-of-pangasius-catfish-farmed-in-vietnam/?headlessPrint=AAAAPIA9c8r7gs82oWZ>
- Dung, T. T., Tien, N. T., & Tuan, N. A. (2012). Study the aetiological agent causing white patch disease in catfish farm (*Pangasianodon hypophthalmus*) and therapy solution. *Can Tho University Journal of Science*, 22(c), 136–145 (in Vietnamese).
- Elgendy, M. Y., Abdelsalam, M., Kenawy, A. M., & Ali, S. E. (2022). *Vibriosis* outbreaks in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) caused by *Vibrio mimicus* and *V. cholerae*. *Aquaculture International*, 30(5), 2661–2677. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00921-8>
- Erickson, V. I., Khoi, L. M., Hounmanou, Y. M. G., Dung, T. T., Phu, T. M., & Dalsgaard, A. (2023). Comparative genomic analysis of *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* from diseased striped catfish fingerlings cultured in Vietnam. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1254781. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1254781>
- FAO. (2022). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Feng, Y., Wang, J., Fan, W., Geng, Y., Huang, X., Ouyang, P., & Zuo, Z. (2023). Integrated bioinformatics identifies key mediators in cytokine storm and tissue remodeling during *Vibrio mimicus* infection in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Frontiers in Immunology*, 14, 1172849. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1172849>
- Frerichs, G. N., & Millar, S. D. (1993). *Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens*. Stirling : Pisces Press in association with the Institute of Aquaculture, University of Stirling.
- Geng, Y., Liu, D., Han, S., Zhou, Y., Wang, K. Y., Huang, X. L., & Lai, W. M. (2014). Outbreaks of *Vibriosis* associated with *Vibrio mimicus* in freshwater catfish in China. *Aquaculture*, 433, 82–84. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.053>
- Guardiola-Avila, I., Noriega-Orozco, L., Acedo-Félix, E., Lara, A. E., & Tapia-Olea, M. M. (2015). Presence of the hemolysin gene of *Vibrio mimicus* in fish and seafood products in Sonora, México. *Journal of Food Research*, 4(1), 66. <https://doi.org/10.5539/jfr.v4n1p66>
- Guardiola-Avila, I., Acedo-Felix, E., Sifuentes-Romero, I., Yepiz-Plascencia, G., Gomez-Gil, B., & Noriega-Orozco, L. (2016). Molecular and genomic characterization of *Vibrio mimicus* isolated from a frozen shrimp processing facility in Mexico. *PLoS One*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144885>
- Guardiola-Avila, I., Sánchez-Busó, L., Acedo-Félix, E., Gomez-Gil, B., Zúñiga-Cabrera, M., González-Candelas, F., & Noriega-Orozco, L. (2021). Core and accessory genome analysis of *Vibrio mimicus*. *Microorganisms*, 9(1), 191. <https://doi.org/10.3390%2Fmicroorganisms9010191>
- Huynh, T. G., Nguyen, T. P., Vu, N. U., Jack, M., & Truong, Q. P. (2016). Assessment of water quality in catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) production systems in the Mekong Delta. *Can Tho University Journal of Science*, 3, 71–78. <https://doi.org/10.22144/ctu.jen.2016.026>
- Jiang, Z., Gao, X., Jiang, Q., Zhu, X., Zhou, Y., Zhang, Z., & Zhang, X. (2022). Genomic characterization and pathogenicity analysis of the *Vibrio mimicus* Y4 causing red body disease in *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture*, 548, 737701. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737701>
- Kar, D., & Aurobindo, R. (2021). Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) Fish Disease Chronology, Status and Major Outbreaks in the World. *Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research*, 23(2), 29-38. <https://doi.org/10.2478/trser-2021-0012>
- Li, Y. W., Zhang, X., Cai, Y. J., Chen, S. Y., Sun, H. Y., & Dan, X. M. (2019). Effective method to control *Vibrio mimicus* infection in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *African Journal of Biotechnology*, 18(27), 603–611. <https://doi.org/10.5897/AJB2019.16859>
- Ly, L. T. T., Nguyen, D. N., Vo, P. H., & Doan, C. Van. (2009). Hemorrhage disease of cultured tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Mekong Delta (Vietnam). *Israeli journal of aquaculture-Bamidgeh*, 61. <http://dx.doi.org/10.46989/001c.20557>
- Nahar, S., Rahman, M. M., Ahmed, G. U., & Faruk, M. A. R. (2016). Isolation, identification, and characterization of *Aeromonas hydrophila* from juvenile farmed pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(4), 52–60.
- Nilavan, E., Vaiyapuri, M., Sadanandan Sheela, G., Nadella, R. K., Thandapani, M., Kumar, A., & Mothadaka, M. P. (2021). Prevalence of *Vibrio mimicus* in fish, fishery products, and environment of South West Coast of Kerala, India. *Journal of AOAC International*, 104(3), 790–794.

- <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsab001>
- Noga, E. J. (2000). Skin ulcers in fish: *Pfiesteria* and other etiologies. *Toxicologic Pathology*, 28(6), 807–823.
- Noga, E. J. (2010). Fish Disease: Diagnosis and treatment. *John Wiley & Sons*. 538 pages.  
<https://doi.org/10.1177/019262330002800607>
- Raja, R. A., Panigrahi, A., De, D., & Kumar, S., 2017. Investigations on white spot disease outbreak in *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) in association with *Vibrio mimicus* infection in the Sunderbans, West Bengal, India. *Indian Journal of Fisheries*, 64(1), 56–60.  
<http://dx.doi.org/10.21077/ijf.2017.64.1.54833-09>
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent end points. *The American Journal of Hygiene*, 27(3), 493–497.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Sadi, N. H., & Yoga, G. P. (2021). Skin characteristic of Pangasius Catfish in Indonesia. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 789, No. 1, p. 012026). IOP Publishing.  
<http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/789/1/012026>
- Tarr, C.L., Patel, J.S., Puhr, N.D., Sowers, E.G., Bopp, C.A. and Strockbine, N.A. (2007) Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 134–140. <https://doi.org/10.1128%2FJCM.01544-06>
- Tien, N. T., Dung, T. T., Tuan, N. A., & Crumlish, M. (2012). First identification of *Flavobacterium columnare* infection in farmed freshwater striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 100(1), 83–88.  
<https://doi.org/10.3354/dao02478>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703.  
<https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Xiao, Y., Huang, Z., Yu, K., Wang, M., Gao, H., Bai, X., & Wang, D. (2022). Distribution and molecular characteristics of *Vibrio* species isolated from aquatic environments in China, 2020. *Microorganisms*, 10(10), 2007.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10102007>
- Yu, Z., Wang, E., Geng, Y., Wang, K., Chen, D., Huang, X., & Zhong, Z. (2020). Complete genome analysis of *Vibrio mimicus* strain SCCF01, a highly virulent isolate from the freshwater catfish. *Virulence*, 11(1), 23–31.  
<https://doi.org/10.1080%2F21505594.2019.1702797>
- Zhang, X., Li, Y. W., Mo, Z. Q., Luo, X. C., Sun, H. Y., Liu, P., & Dan, X. M. (2014). Outbreak of a novel disease associated with *Vibrio mimicus* infection in fresh water cultured yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*, 432, 119–124.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.039>