

**PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CÁC CHỦNG  
*Streptococcus agalactiae* GÂY BỆNH TRÊN CÁ RÔ PHI ĐỎ (*Oreochromis* sp.) NUÔI  
TẠI THỪA THIÊN HUẾ**

**Nguyễn Ngọc Phước\*, Trần Thị Nhật Anh, Nguyễn Thị Huệ Linh**

**\*Tác giả liên hệ:**

Nguyễn Ngọc Phước

**Email:**

nguyenngocphuc@huaf.edu.vn

Trường Đại học Nông Lâm,

Đại học Huế

Nhận bài: 27/08/2019

Chấp nhận bài: 14/10/2019

**Từ khóa:** Cá rô phi,  
*Oreochromis* sp., *Streptococcus*  
*agalactiae*, Tan huyết  $\beta$ , Thừa  
Thiên Huế

**TÓM TẮT**

*Streptococcus agalactiae* là một trong những tác nhân chính gây bệnh trên cá diêu hồng hay rô phi đỏ (*Oreochromis* sp.) nuôi trên thế giới. Nghiên cứu này đã phân lập được 27 chủng cầu khuẩn *Streptococcus* trên cá rô phi bị bệnh nuôi tại thị xã Hương Trà và Hương Thủy, tỉnh Thừa Thiên Huế. Cá rô phi bị bệnh có các dấu hiệu bệnh lý đặc trưng như mắt lồi, bơi xoắn ốc, xuất huyết ở các gốc vây và viêm màng não. Kết quả định danh bằng phản ứng ngưng kết kháng nguyên (Lancefield test) cho thấy tất cả 27 chủng này đều là vi khuẩn *S. agalactiae* nhóm B, các chủng vi khuẩn này có hình cầu, phản ứng âm tính với oxidase, catalase, bile esculine và gây tan huyết hoàn toàn (tan huyết  $\beta$ ) trên môi trường thạch máu. Các chủng vi khuẩn phân lập được khá đồng nhất về đặc điểm sinh hóa. Liều gây chết 60% đối với cá rô phi thí nghiệm của các chủng HT 1.1 là  $5 \times 10^4$  cfu/mL, chủng HTH 2.3 và chủng BD 1.2 là  $2 \times 10^4$  cfu/mL. Các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập được trên cá rô phi đỏ nuôi tại Thừa Thiên Huế nhạy cảm với các loại kháng sinh ampicillin, amoxicillin và oxacillin.

**1. MỞ ĐẦU**

Cá rô phi đỏ hay còn gọi là cá diêu hồng (*Oreochromis* sp.) thuộc họ Cichlida, bộ Perciformes là đối tượng được nuôi ở rất nhiều nước trên thế giới và là mặt hàng thực phẩm có giá trị trên toàn cầu. Tuy nhiên nghề nuôi cá rô phi đang đối mặt với nhiều thách thức, đặc biệt là dịch bệnh do bệnh truyền nhiễm gây ra. Liên cầu khuẩn (*Streptococcus* sp.) là tác nhân gây ra thiệt hại lớn đối với nghề nuôi cá rô phi trên thế giới (Shoemak và cs., 2008). Trong vòng 7 ngày, nhóm vi khuẩn này có thể gây ra tỷ lệ chết lên đến 70% trên cá rô phi dẫn đến những thiệt hại về kinh tế hết sức trầm trọng đối với người nuôi (Wongsathein, 2012). Tại Việt Nam, tần suất xuất hiện vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* trên cá rô phi nuôi

tại An Giang và Vĩnh Long rất cao, tỉ lệ cảm nhiễm vi khuẩn này trên cá rô phi từ 95 - 100% và gây ra thiệt hại nặng nề về kinh tế cho người nuôi (Đinh Thị Thủy, 2007). Ở miền Bắc, vi khuẩn *S. agalactiae* cũng là tác nhân gây bệnh chính gây ra tỷ lệ chết cao trên cá rô phi nuôi vào mùa khô với tỷ lệ chết trung bình lên đến 45% và là nguyên nhân chính là sụt giảm nghiêm trọng về sản lượng cá rô phi tại các tỉnh phía Bắc trong năm 2009 (Đông Thanh Hà, 2010). Tại Thừa Thiên Huế, cá rô phi (*Oreochromis* sp.) là đối tượng nước ngọt được nuôi phổ biến ở các hồ chứa và lưu vực các sông như sông Bồ, sông Hương, là nguồn thu nhập chính cho người dân địa phương. Trong những năm gần đây, dịch bệnh trên cá rô phi nuôi tại tỉnh Thừa Thiên Huế xảy ra thường xuyên với dấu hiệu bệnh lý điển hình do vi

khuẩn *S. agalactiae* gây ra như mắt bị lồi đục và tỷ lệ chết lên đến 60-70% trong 5-7 ngày. Tuy nhiên, vẫn chưa có một nghiên cứu cụ thể nào về dịch bệnh này trên cá rô phi nuôi tại Thừa Thiên Huế. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm phân lập, xác định đặc điểm sinh hoá và đánh giá khả năng miễn cảm kháng sinh của chúng vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi nuôi, góp phần hạn chế dịch bệnh và nâng cao năng suất cá nuôi tại tỉnh Thừa Thiên Huế.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Địa điểm thu mẫu

Mẫu cá bệnh được thu trực tiếp tại 08 hộ nuôi cá rô phi đỏ (*Oreochromis sp.*) lồng tại phường Tứ Hạ (4 hộ) và xã Bình Điền (2 hộ) thuộc thị xã Hương Trà và phường Phú Bài (2 hộ) thuộc thị xã Hương Thủy trong tháng 4 và tháng 5 năm 2018. Tại mỗi hộ tiến hành thu 3-5 con cá có dấu hiệu bệnh lý điển hình để quan sát các dấu hiệu bệnh lý bên ngoài và dấu hiệu bệnh tích bên trong cơ thể.

### 2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn

Tiến hành thu mẫu chọn lọc: thu mẫu cá có các biểu hiện như bơi lội không bình thường, vận động khó khăn không định hướng, bơi gần mặt nước, bơi vòng tròn hoặc đớp không khí, mắt lồi và đục, có xuất huyết ở các vây và xương nắp mang (Abuseliana và cs., 2010).

Thu mẫu vi khuẩn được tiến hành tại hiện trường bằng cách dùng dao mổ đã được tiệt trùng bằng cồn 90°, mở hộp sọ của cá, dùng que cấy nhựa tiệt trùng đâm thẳng vào khối não rồi cấy lên môi trường Tryptone Soya Agar (TSA, HiMedia, Ấn Độ) đã được chuẩn bị sẵn. Dùng parafin bao kín lại và giữ ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ.

### 2.3. Phương pháp định danh vi khuẩn bằng kiểu huyết thanh

Kiểu huyết thanh được xác định bằng phương pháp ngưng kết miễn dịch theo

phương pháp Lancefield (Lancefield, 1933) với bộ kit Strep-B-Latex (GBS) (Đan Mạch) với các bước như sau:

Đầu tiên lấy hai giọt dung dịch latex (khoảng 10 µL/giọt) nhỏ lên giấy thử theo từng nhóm A, B, C, D, F, G. Dùng que cấy tiệt trùng lấy khoảng từ 3-5 khuẩn lạc cho vào 3 mL nước muối sinh lý, sau đó cho 100 µL dung dịch lysis vào và ủ ở nhiệt độ 55°C trong 10 phút ở nổi cách thủy, tiếp theo nhỏ một giọt dung dịch vi khuẩn lên các nhóm A, B, C, D, F và G tương ứng. Dùng tăm tiệt trùng trộn đều 2 dung dịch. Phản ứng dương tính sẽ có ngưng kết xuất hiện trong 5 – 10 giây.

Kết quả: Nếu phản ứng ngưng kết xảy ra ở:

Nhóm A: vi khuẩn *Streptococcus pyogenes*

Nhóm B: vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

Nhóm C: vi khuẩn *Streptococcus equi*

Nhóm D: vi khuẩn *Enterococci*

Nhóm F: vi khuẩn *Streptococcus anginosus*

Nhóm G: vi khuẩn *Streptococcus constelatus*

### 2.4. Phương pháp xác định một số đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được

Các phản ứng cơ bản gồm có: nhuộm Gram, oxidase, phản ứng oxi hoá/lên men đường Glucose (O/F glucose), khả năng tan huyết trên môi trường thạch có chứa 5% máu ngựa, khả năng mọc ở môi trường TSB + 6.5% NaCl, phản ứng Lysine decarboxylase (LDC), khả năng làm kết tủa huyết thanh thô đông khô và phản ứng Bile-esculine được tiến hành theo hướng dẫn của công ty Nam Khoa (Việt Nam). Xác định khả năng di động và phản ứng catalase được

tiến hành theo phương pháp của Wongsathien (2012). Ngoài ra, đặc điểm sinh hóa các chủng vi khuẩn phân lập cũng được tiến hành trên bộ kit API 20 Strep (analytical profile index) (Bio-Mérieux, Pháp) theo hướng dẫn của sản phẩm và nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C, đọc kết quả sau 24 giờ. Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* NCIMB 701348 được sử dụng để làm kết quả so sánh.

## 2.5. Phương pháp gây bệnh thực nghiệm

### 2.5.1. Chuẩn bị vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* sau khi công cường độc lực được nuôi cấy trên môi trường thạch TSA ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Sau đó, lấy 1 khuẩn lạc rời trên đĩa thạch nuôi cấy tăng sinh trong 10 mL môi trường Tryptone Soya Broth (TSB, HiMedia, Ấn Độ) trong máy ủ lắc (LM-4200, Yinder, Trung Quốc) ở nhiệt độ 28°C, tốc độ 100 vòng/phút trong 24 giờ. Dung dịch vi khuẩn được ly tâm với tốc độ 3000 vòng trong 20 phút bằng máy ly tâm (Digisystem Laboratory Instruments Inc., Đài Loan), loại bỏ phần dịch nổi và thu phần vi khuẩn. Cho 10 mL dung dịch nước muối sinh lý 0.85% NaCl vào để tạo huyền phù. Lấy 1 mL huyền phù vi khuẩn đo OD bằng máy so màu quang phổ (Spectrophotometer model 4111 RS, Zuzi, Tây Ban Nha) ở bước sóng 620 nm, dùng nước muối sinh lý pha loãng đến giá trị OD của huyền phù  $OD_{620} = 1$  (tương đương  $10^8$  cfu/mL, số liệu không công bố). Sau đó pha loãng vi khuẩn theo các mật độ từ  $10^3$ - $10^8$  cfu/mL.

### 2.5.2. Cá thí nghiệm

Cá sử dụng cho thí nghiệm cảm nhiễm là cá rô phi đỏ (*Oreochromis* sp.) có trọng lượng khoảng 30 g/con, khỏe mạnh được cung cấp từ Trung tâm giống thủy sản Thừa Thiên Huế. Cá được nuôi thuần 14 ngày trước khi thí nghiệm.

Trước khi tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm, đàn cá được kiểm tra không cảm nhiễm vi khuẩn bằng cách thu mẫu vi khuẩn từ não của 5 con cá ngẫu nhiên. Dùng que cấy nhựa tiệt trùng đâm thẳng vào khối não của cá rồi cấy lên môi trường TSA đã được chuẩn bị sẵn. Dùng parafin bao kín lại và giữ ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ.

### 2.5.3. Phương pháp công cường độc lực

Lấy khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* đã được phân lập, tiến hành nuôi tăng sinh trong TSB trong 24 giờ. Dung dịch huyền phù sau 24 giờ nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 4.000 vòng/phút trên máy ly tâm (Lab Centrifuge, Digisystem Laboratory, Đức). Loại bỏ phần dịch nổi, sau đó cho thêm 1 mL nước muối sinh lý (0,86 % NaCl), trộn đều trên máy Vortex. Lấy 0.1 mL dung dịch vi khuẩn trên tiêm cho cá.

Sau 1-2 ngày, nếu cá chết thì tiến hành thu mẫu vi khuẩn bằng cách lấy que cấy vô trùng đưa vào não cá, sau đó cấy lên đĩa petri có chứa môi trường TSA. Ủ 24 giờ ở nhiệt độ 30°C. Vi khuẩn thu được sau khi định danh lại là *S. agalactiae* bằng phản ứng sinh hoá được lưu giữ trong Glycerol 15% và bảo quản ở -20°C ở tủ lạnh sâu để dùng cho các thí nghiệm cảm nhiễm (Nguyễn Ngọc Phước và cs., 2015). Các chủng gây chết cá sau 24 giờ được chọn để xác định liều gây chết LD<sub>60</sub>.

### 2.5.4. Thí nghiệm xác định liều gây chết 60% (LD<sub>60</sub>- Lethal dose 60)

Từ kết quả của thí nghiệm công cường độc lực, 3 chủng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập tại phường Tứ Hạ, xã Bình Điền (thị xã Hương Trà), và phường Phú Bài (thị xã Hương Thủy) là *S. agalactiae* HT1.1, HTH 2.3 và BĐ 1.2 được chọn để xác định liều gây chết LD<sub>60</sub>. Thí nghiệm xác định giá trị LD<sub>60</sub> được bố trí trên

7 nghiệm thức bao gồm: 6 nghiệm thức thí nghiệm và 1 nghiệm thức đối chứng. Mỗi nghiệm thức gồm 10 con cá được nuôi trong bể nhựa (V = 50 L). Cá trước khi cảm nhiễm được gây mê bằng Aquis (Bayer, Việt Nam) với liều lượng 0.02 mL/L nước. Cá được cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm vào xoang bụng. Trong 6 nghiệm thức thí nghiệm: cá ở mỗi nghiệm thức được tiêm 0,1 mL với một trong sáu mật độ vi khuẩn *S. agalactiae* từ  $1 \times 10^8$  đến  $1 \times 10^3$  cfu/mL. Ở nghiệm thức đối chứng, cá được tiêm 0.1 mL nước muối sinh lý (0.85% NaCl) vô trùng. Cá sau khi tiêm được nuôi trong bể nhựa 50 L với hệ thống nước chảy tốc độ 14 L/ phút, nhiệt độ duy trì trong khoảng 28-30°C. Cho ăn bằng thức ăn Cargill (Việt Nam) ở mức duy trì (3% trọng lượng thân). Sục khí liên tục 24 giờ/ngày. Tỷ lệ chết được theo dõi trong 14 ngày. Giá trị LD<sub>60</sub> được xác định theo phương pháp của Reed-Muench.

Dựa vào số lượng cá chết ở các nghiệm thức để tính LD<sub>60</sub> theo công thức sau:

$$LD_{60} = 10^{a-x}$$

Trong đó:

- a là số lữ thừa mà tại đó vi khuẩn gây cá chết thấp nhất (trên 60%)
- x được tính dựa vào công thức:  $x = (P_a - 60)/(P_a - P_u)$

Với: P<sub>a</sub> là tỷ lệ chết cận trên và P<sub>u</sub> là tỷ lệ chết cận dưới của liều gây chết 60%

## 2.6. Phương pháp thử độ nhạy kháng sinh

Khả năng miễn cảm kháng sinh của vi

khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo phương pháp của Kirby Bauer và cs. (1966).

Dùng que cấy tiết trùng lấy khuẩn lạc trên đĩa vi khuẩn cho vào ống nghiệm chứa 10 mL nước muối sinh lý (0,86% NaCl) đã tiết trùng. Trộn đều và xác định mật độ vi khuẩn đạt  $10^8$  cfu/mL, lấy 100  $\mu$ L huyền phù vi khuẩn cấy trên môi trường Mueller Hinton (Himedia, Ấn độ), để khô khoảng 10 phút sau đó đặt các khoanh giấy có tẩm các loại kháng sinh ofloxacin, tetracycline, oxacillin, ampicillin, amocillin và streptomycin lên đĩa thạch, nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C. Tiến hành đo đường kính vòng vô khuẩn sau 24 giờ. Đánh giá khả năng nhạy cảm hay kháng kháng sinh của vi khuẩn dựa trên dựa trên đường kính vòng vô khuẩn theo tiêu chuẩn của Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016).

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn bằng kiểu huyết thanh

Từ các mẫu cá rô phi bị bệnh nuôi tại 4 hộ nuôi cá lồng trên sông Bồ, phường Tứ Hạ, 2 hộ nuôi cá lồng ở xã Bình Điền (thị Hương Trà), 2 hộ nuôi cá rô phi lồng ở hồ chứa Phú Bài, phường Phú Bài (thị xã Hương Thủy) thuộc tỉnh Thừa Thiên Huế đã phân lập được 27 chủng vi khuẩn. Kết quả phân lập và định danh 27 chủng vi khuẩn từ não của mẫu cá bệnh được trình bày ở bảng 1.

30 mẫu cá rô phi thu được có biểu hiện bệnh như: cá bệnh bơi lơ đờ, hoạt động chậm chạp, kém linh hoạt, bơi lội mất phương hướng, mắt lồi và đục (Hình 1).

**Bảng 1.** Kết quả định danh bằng kiểu huyết thanh (Lancefield) từ các mẫu cá bệnh thu tại các lồng nuôi ở thị xã Hương Trà và Hương Thủy, tỉnh Thừa Thiên Huế

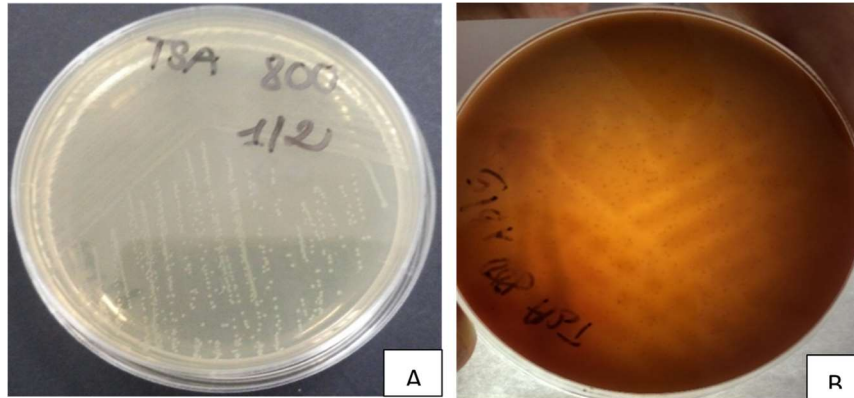
Địa điểm thu mẫu	Mẫu thu	Kiểu huyết thanh (Lancefield)	Kết quả định danh (chủng)	
Phường Tứ Hạ	HT 1.1	Nhóm B	<i>Streptococcus agalactiae</i> HT1.1	
	Hộ 1 HT 1.2		<i>S. agalactiae</i> HT1.2	
	HT 1.3		<i>S. agalactiae</i> HT1.3	
	Hộ 2	HT 2.1	Nhóm B	<i>S. agalactiae</i> HT2.1
		HT 2.2		<i>S. agalactiae</i> HT2.2
		HT 2.3		<i>S. agalactiae</i> HT2.3
	Hộ 3	HT 3.1	Nhóm B	<i>S. agalactiae</i> HT3.1
		HT 3.2		<i>S. agalactiae</i> HT3.2
		HT 3.3		<i>S. agalactiae</i> HT3.3
	Hộ 4	HT 4.1	Nhóm B	<i>S. agalactiae</i> HT4.1
		HT 4.2		<i>S. agalactiae</i> HT4.2
		HT 4.3		<i>S. agalactiae</i> HT4.3
Phường Phú Bài	HTH 1.1	Nhóm B	<i>S. agalactiae</i> HHT1.1	
	Hộ 1 HTH 1.2		<i>S. agalactiae</i> HHT1.2	
	HTH 1.3		<i>S. agalactiae</i> HHT1.3	
	HTH 1.4		<i>S. agalactiae</i> HHT1.4	
	Hộ 2	HTH 2.1	Nhóm B	<i>S. agalactiae</i> HHT2.1
		HTH 2.2		<i>S. agalactiae</i> HHT2.2
Xã Bình Điền	BĐ 1.1	Nhóm B	<i>S. agalactiae</i> BĐ1.1	
	BĐ 1.2		<i>S. agalactiae</i> BĐ1.2	
	Hộ 1 BĐ 1.3		<i>S. agalactiae</i> BĐ1.3	
	BĐ 1.4		<i>S. agalactiae</i> BĐ1.4	
	BĐ 1.5		<i>S. agalactiae</i> BĐ1.5	
	Hộ 2	BĐ 2.1	Nhóm B	<i>S. agalactiae</i> BĐ2.1
		BĐ 2.2		<i>S. agalactiae</i> BĐ2.2
	BĐ 2.3		<i>S. agalactiae</i> BĐ2.3	



**Hình 1.** Cá rô phi bị bệnh với dấu hiệu đặc trưng là mắt lồi đục (vòng tròn)

Tất cả các chủng vi khuẩn phân lập được đều tạo ra các khuẩn lạc tròn, đều, màu trắng sữa trên môi trường TSA (Hình 2A), gây khả năng tan huyết hoàn toàn (tan huyết

$\beta$ ) trên môi trường thạch máu (BA) (Hình 2B) và tạo phản ứng ngưng kết nhóm B Lancefield (Hình 3).



**Hình 2.** Khuẩn lạc các chủng vi khuẩn phân lập có màu trắng, nhỏ và tròn trên môi trường TSA (A) và gây tan huyết  $\beta$  trên môi trường thạch máu (BA) (B)

Phản ứng ngưng kết miễn dịch dựa trên nguyên tắc của sự liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể có thể nhìn thấy được ở dạng kết tủa (Gella và cs., 1991). Trong nghiên cứu này, phản ứng ngưng kết miễn dịch giúp phát hiện nhanh và nhận dạng kiểu

huyết thanh của vi khuẩn *S. agalactiae*. Kết quả cho thấy có 27/27 các chủng vi khuẩn (chiếm 100%) cho kết quả dương tính giúp xác định các chủng vi khuẩn phân lập được là *S. agalactiae* nhóm B (Hình 3).



**Hình 3.** Phản ứng xác định kiểu huyết thanh theo nhóm Lancefield của chủng vi khuẩn phân lập được từ cá rô phi bệnh cho thấy phản ứng ngưng kết xảy ra ở nhóm B

### 3.2. Kết quả kiểm tra đặc điểm sinh hóa các chủng vi khuẩn phân lập được

Từ các đặc tính sinh hoá đặc trưng của *Streptococcus* spp. là các phản ứng: catalase, oxidase, huyết tương thỏ đông khô, LDC, TSB 6,5% NaCl, bile esculine cho thấy 27 chủng *S. agalactiae* phân lập được

tại Thừa Thiên Huế khá đồng nhất về mặt sinh hóa (Bảng 2). 100% các chủng cho phản ứng âm tính với catalase, Bile Esculine và oxidase. Tất cả các chủng không phát triển trong môi trường TSB 6,5% NaCl. Phản ứng với huyết tương thỏ đông khô cho kết quả 100% chủng có khả năng gây ngưng kết hoàn toàn. 100% các chủng cho phản

ứng dương tính với Lysine decarboxylase (LDC). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu về đặc tính sinh học của vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây bệnh xuất huyết ở cá rô phi nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam của Phạm Hồng Quân vào năm 2013.

Các môi trường đường sử dụng đều cho kết quả khá đồng nhất giữa các chủng phân lập được (Bảng 2). Tất cả các chủng phân lập được có khả năng sử dụng đường ribose, lactose và trehalose. 100% các chủng phân lập được không có khả năng sử dụng

đường arabino, manitol, sorbitol, và inulin. Chỉ có 2/27 chủng (11.1%) có khả năng sử dụng đường raffinose, glycogen và amygdalin. Có 25/27 chủng (chiếm 92.5%) cho phản ứng dương tính với Voges-Proskauer. Các sai khác về đặc điểm sinh hóa giữa các chủng *S. agalactiae* phân lập được tại Thừa Thiên Huế so với chủng *S. agalactiae* NCIMB 701348 có thể do khi sử dụng các kit sinh hóa được thương mại hóa cho độ nhạy không cao so với các phương pháp khác (Bader và cs., 1998).

**Bảng 2.** Đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn *Streptococcus* spp. phân lập được từ cá rô phi bị bệnh và chủng *S. agalactiae* NCIMB 701348 được sử dụng để làm kết quả so sánh

Chỉ tiêu	<i>Streptococcus agalactiae</i> NCIMB 701348	Tỷ lệ % chủng vi khuẩn phân lập	
		Dương tính	Âm tính
Nhuộm Gram	(+)	100	0
Hình thái	Hình cầu		Hình cầu
Di động	Không		Không
Khả năng tan huyết	$\beta$		100 ( $\beta$ )
Oxidase	(-)		100
Catalase	(-)		100
Bile Esculine	(-)		100
Huyết tương thô đông khô	(+)	100	
LDC	(+)	100	
Voges-Proskauer	(+)	92,5	7,5
Hypurate hydrolysis	(+)	89,9	11,1
Pyrolidonylarylamidase	(-)	11,1	88,9
Ribose	(+)	100	
Arabinose	(-)		100
Manitol	(-)		100
Sorbitol	(-)		100
Lactose	(+)	100	
Trehalose	(+)	100	
Inulin	(-)		100
Raffinose	(-)	11,1	88,9
Glycogen	(-)	11,1	88,9
Amygdalin	(-)	11,1	88,9
TSB 6.5% NaCl	(-)		100

(+): phản ứng dương tính; (-) phản ứng âm tính

**3.3. Kết quả gây bệnh thực nghiệm trên cá rô phi**

Khả năng gây chết của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* HT 1.1, HTH 2.3 và BD

1.2 trên cá rô phi (*Oreochromis* sp.) ở các mật độ vi khuẩn khác nhau được thể hiện ở Bảng 3, 4 và 5.

**Bảng 3.** Tỷ lệ chết cộng dồn ở các lô thí nghiệm khi cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* HT 1.1 với các mật độ pha loãng khác nhau

Nồng độ pha loãng	Mật độ vi khuẩn (cfu/mL)	Số cá		Tổng số cộng dồn			Tỷ lệ chết cộng dồn (%)
		Chết	Sống	Chết	Sống	Tổng	
0	10 <sup>8</sup>	10	0	45	0	45	100
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>7</sup>	9	1	35	1	36	97,22
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>6</sup>	9	1	26	2	28	92,86
10 <sup>-3</sup>	10 <sup>5</sup>	7	3	17	5	22	77,27
10 <sup>-4</sup>	10 <sup>4</sup>	6	4	10	9	19	52,63
10 <sup>-5</sup>	10 <sup>3</sup>	4	6	4	15	19	21,05

Từ kết quả Bảng 3, liều gây chết 60% số cá thí nghiệm (LD<sub>60</sub>) của chủng vi

khuẩn *S. agalactiae* HT1.1 được xác định là 5 x 10<sup>4</sup> cfu/mL.

**Bảng 4.** Tỷ lệ chết cộng dồn ở các lô thí nghiệm khi cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* HTH 2.3 với các mật độ pha loãng khác nhau

Nồng độ pha loãng	Mật độ vi khuẩn (cfu/mL)	Số cá		Tổng số cộng dồn			Tỷ lệ chết cộng dồn (%)
		Chết	Sống	Chết	Sống	Tổng	
0	10 <sup>8</sup>	10	0	45	0	45	100
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>7</sup>	9	1	35	1	36	97,22
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>6</sup>	9	1	26	2	28	92,86
10 <sup>-3</sup>	10 <sup>5</sup>	8	2	17	4	21	80,95
10 <sup>-4</sup>	10 <sup>4</sup>	5	5	9	9	18	50
10 <sup>-5</sup>	10 <sup>3</sup>	4	6	4	15	19	15

Từ kết quả Bảng 4, liều gây chết 60% số cá thí nghiệm (LD<sub>60</sub>) của chủng vi

khuẩn *S. agalactiae* HTH 2.3 được xác định là 2 x 10<sup>4</sup> cfu/mL.

**Bảng 5.** Tỷ lệ chết cộng dồn ở các lô thí nghiệm khi cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* BD 1.2 với các mật độ pha loãng khác nhau

Nồng độ pha loãng	Mật độ vi khuẩn (cfu/mL)	Số cá		Tổng số cộng dồn			Tỷ lệ chết cộng dồn (%)
		Chết	Sống	Chết	Sống	Tổng	
0	10 <sup>8</sup>	10	0	43	0	43	100
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>7</sup>	9	1	33	1	34	97,05
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>6</sup>	8	2	24	3	27	88,9
10 <sup>-3</sup>	10 <sup>5</sup>	7	3	16	6	22	72,72
10 <sup>-4</sup>	10 <sup>4</sup>	6	4	9	10	19	47,36
10 <sup>-5</sup>	10 <sup>3</sup>	3	7	3	17	20	15

Từ kết quả Bảng 5, liều gây chết 60% số cá thí nghiệm (LD<sub>60</sub>) của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* BD 1.2 được xác định là 2 x 10<sup>4</sup> cfu/mL.

cfu/mL.

Kết quả tiến hành cảm nhiễm gây bệnh thực nghiệm bằng các chủng vi khuẩn đã phân lập được cho thấy độc lực vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập trên cá rô phi nuôi tại Thừa Thiên Huế khá giống nhau, ngưỡng gây chết 60% từ 2 x 10<sup>4</sup> – 5 x 10<sup>4</sup>

Các dấu hiệu bệnh lý ở cá rô phi khi gây bệnh thực nghiệm là mất lời và mờ đục, não bị xuất huyết trong nghiên cứu này hoàn toàn giống với các dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của bệnh do vi khuẩn *Streptococcus* gây ra trên cá rô phi (Abuseliana và cs., 2010; Anshary và cs., 2014).



### 3.5 Kết quả thử khả năng miễn cảm đối với một số loại kháng sinh

Kết quả thử khả năng miễn cảm của *S. agalactiae* với 6 loại kháng sinh ofloxacin, tetracycline, oxacillin, ampicillin, amocillin và streptomycin được thể hiện ở Bảng 6.

**Bảng 6.** Độ miễn cảm kháng sinh của các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập tại Thừa Thiên Huế

Kháng sinh	Tỷ lệ % <i>S. agalactiae</i>	
	Nhạy cảm	Kháng
Ofloxacin	96,3	3,7
Tetracycline	40,7	59,3
Oxacillin	50	50
Ampicillin	33,3	66,7
Amocillin	92,5	7,5
Streptomycin	63,9	36,1

Ofloxacin thuộc nhóm fluoroquinolon có tác dụng diệt khuẩn cao đối với Gram (+) nên có thể sử dụng loại kháng sinh này trong điều trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá nuôi. Ampicilline, amoxicillin và oxacillin đều thuộc nhóm  $\beta$ -lactam có phổ kháng khuẩn trung bình, tác dụng mạnh trên vi khuẩn Gram (+). Kết quả nghiên cứu của Abuseliana và cs. (2010) cũng cho thấy hai loại kháng sinh ampicilline và amoxicillin đều có khả năng miễn cảm với *S. agalactiae*. Trong nghiên cứu này, *S. agalactiae* phân lập trên cá rô phi ở Thừa Thiên Huế đều miễn cảm với 3 loại kháng sinh thuộc nhóm  $\beta$ -lactam trong đó amocillin có tác dụng mạnh nhất. Tetracycline là loại kháng sinh được dùng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản, và trong nghiên cứu này có tới 40.7% chủng vi khuẩn nhạy với loại kháng sinh này. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Atalay và cs. (2011) thì tetracycline không có tác dụng với vi khuẩn *S. agalactiae* do vậy không nên sử dụng loại kháng sinh này để điều trị bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên cá nuôi.

### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 27 chủng *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi nuôi tại tỉnh Thừa Thiên Huế. Các chủng *S.*

Trong 8 loại kháng sinh được sử dụng để thử nghiệm cho thấy *S. agalactiae* miễn cảm cao với hai loại kháng sinh ofloxacin và amocillin (Bảng 6). Trong khi đó có tới 66.7% các chủng vi khuẩn kháng với ampicillin.

*S. agalactiae* khá đồng nhất về mặt sinh hóa. Các chủng vi khuẩn phát triển trên môi trường TSA sau 24 giờ ở 28°C tạo khuẩn lạc nhỏ, hình tròn, có màu kem, và gây tan huyết trên môi trường thạch máu. Các chủng này đều là vi khuẩn Gram dương, hình cầu, không di động, oxidase và catalase âm tính.

Liều gây chết 60% cá thí nghiệm của các chủng *S. agalactiae* phân lập được trên cá rô phi nuôi tại Thừa Thiên Huế là  $2 \times 10^4 - 5 \times 10^4$  cfu/mL.

Các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập được trên cá rô phi nuôi tại Thừa Thiên Huế nhạy cảm với các loại kháng sinh ampicillin, amoxicillin và ofloxacin.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

#### 1. Tài liệu tiếng Việt

- Đông Thanh Hà, Nguyễn Viết Khuê và Nguyễn Thị Hạnh. (2010). *Một số đặc điểm của Streptococcus agalactiae, tác nhân gây bệnh Streptococcosis trên cá rô phi ở miền Bắc Việt Nam*. Báo cáo khoa học - Trung tâm nghiên cứu quan trắc cảnh báo môi trường và phòng ngừa dịch bệnh thủy sản miền Bắc – Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy Sản I.
- Nguyễn Ngọc Phước, Lưu Thị Ngọc Hạnh, Nguyễn Thị Sao, Nguyễn Đức Quỳnh Anh, Trương Thị Hoa và Lê Văn Bảo Duy. (2015). Nghiên cứu một số đặc điểm sinh hóa vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây bệnh trên cá rô phi nuôi tại đồng bằng sông Cửu Long, Việt

- Nam. *Tạp chí Khoa học – Đại học Huế*, 104 (05), 207-219.
- Phạm Hồng Quân, Hồ Thu Thủy, Nguyễn Hữu Vũ, Huỳnh Mỹ Lệ và Lê Văn Khoa. (2013). Một số đặc tính sinh học của vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây bệnh xuất huyết ở cá rô phi nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí khoa học và phát triển*, 11 (4), 506-513.
- Đinh Thị Thủy. (2007). *Nghiên cứu các bệnh nguy hiểm thường gặp ở cá rô phi nuôi thâm canh*. Hà Nội: Liên hiệp các hội Khoa học và Kỹ thuật Việt Nam.
- 2. Tài liệu tiếng nước ngoài**
- Abuseliana, A., Mohd, H. D., Aziz, A. S., Bejo, S. & Alsaïd, M. (2010). *Streptococcus agalactiae* the etiological agent of mass Mortality in farmed red Tilapia (*Oreochromis* sp.). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(20), 2640-2646.
- Anshary, H., Kumiawan, R. A., Sriwulan, S., Ramli, R., & Baxa, D. V. (2014). Isolation and molecular identification of the etiological agents of Streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in net cages in Lake Sentani, Papua, Indonesia. *SpringerPlus*, 3, 627.
- Atalay, A., Ölçü., M., & Perçin, D. (2011). *Antibiotic susceptibilities and serotyping of clinical Streptococcus agalactiae isolates*. Turkey: Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Erciyes University, Kayseri.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., & Sherris, J. C. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493 - 496.
- Buller, N. B. (2004). *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*. UK (Biddles Ltd, King's Lynn): CABI Publishing.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2016). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. USA (Pennsylvania): Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Gella, F. J., Serra J., & Gener, J. (1991). Latex agglutination procedures in immunodiagnosis. *Pure & Applied Chemical*, 63 (8), 1131-1134.
- Lancefield, R. C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic Streptococci. *Journal of Experimental Medicine*, 57 (4), 571-595.
- Shoemaker, C. D., Xu, H., Klesius, P. H., & Evans, J. (2008). *Concurrent infections (parasitism and bacterial disease) in Tilapia*. Paper presented at the 8<sup>th</sup> International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Cairo, Egypt.
- Wongsathein, D. (2012). Factors affecting experimental *Streptococcus agalactiae* infection in tilapia, *Oreochromis niloticus*. Doctoral dissertation of philosophy, University of Stirling, UK.

**ISOLATION AND BIO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF  
*Streptococcus agalactiae* FROM DISEASED RED TILAPIA  
IN THUA THIEN HUE PROVINCE**

**Nguyen Ngoc Phuoc\*, Tran Thi Nhat Anh, Nguyen Thi Hue Linh**

**\*Corresponding Author:**

Nguyen Ngoc Phuoc

**Email:**

nguyenngocphuoc@huaf.edu.vn

University of Agriculture and  
Forestry, Hue University

*Received:* August 27<sup>th</sup>, 2019

*Accepted:* October 14<sup>th</sup>, 2019

**Keywords:** Red tilapia,  
*Oreochromis* sp.,  
*Streptococcus agalactiae*,  $\beta$   
haemolytic, Thua Thien Hue

**ABSTRACT**

*Streptococcus agalactiae* is one of the major pathogens in red tilapia (*Oreochromis* sp.) cultured in the world. In this study, 27 isolates of *Streptococcus* were recovered from diseased red tilapia that showed characteristically pathological signs such as pop-eyes, erotic swimming, hemorrhagic and meningitis. All isolates of *Streptococcus* were recovered from natural diseased fish on red tilapia farms including 2 districts (Huong Tra and Huong Thuy, Thua Thien Hue province). All isolates of *Streptococcus* were identified as Group B *S. agalactiae* by Lancefield test. Biological characteristics of isolates were homogeneous, consisting of cocci, non-motile, negative reaction with oxidase, catalase, bile esculine and showed  $\beta$  haemolytic in the blood agar. The lethal dose of 60% of *S. agalactiae* isolate of HT 1.1 was  $5 \times 10^4$  cfu/mL, and the isolates of HTH 2.3 and BD 1.2 were  $2 \times 10^4$  cfu/mL. The result of the resistant test to antibiotic showed that most of the isolates of *Streptococcus* were sensitive to ampicillin, amoxicillin and oxacillin.