

DOI: 10.22144/ctu.jvn.2018.052

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM BỆNH HỌC CỦA VI KHUẨN *Streptococcus iniae* TRÊN CÁ CHỀM (*Lates calcarifer*)

Trương Thị Hoa^{1*}, Nguyễn Ngọc Phước¹ và Đặng Thị Hoàng Oanh²

¹Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm Huế

²Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trương Thị Hoa (email: hoap0614008@gstudent.ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 12/09/2017

Ngày nhận bài sửa: 26/11/2017

Ngày duyệt đăng: 26/04/2018

Title:

Characteristics of *Streptococcus iniae* infected in barramundi (*Lates calcarifer*)

Từ khóa:

Cá chẽm, LD50, *Streptococcus iniae*, Thừa Thiên Huế

Keywords:

Barramundi, LD50, *Streptococcus iniae*, Thua Thien Hue

ABSTRACT

This study was carried out to identify pathological characteristics of *Streptococcus iniae* which were isolated from cage cultural barramundi (*Lates calcarifer*) in Thua Thien Hue. As a result, 27 isolates were isolated from 50 barramundi samples which displayed hemorrhagic disease and identified as *S. iniae* by using biochemical tests. The bacterial isolates were cocci-shaped, Gram-positive, catalase and oxidase negative, non-motile, positive for hydrolysis of starch, hydrolysis of esculin and negative for hydrolysis of hippurate. Results of slide agglutination test by using Slidex Strepto Plus revealed no reaction with A, B, C, D, F, G serotypes of Lancefield group. Two *S. iniae* strains (HTA1 and HTA3) were selected for pathogenicity test and determination the LD50. The LD50 value of the two *S. iniae* isolates HTA1 and HTA3 in healthy barramundi were 1.9×10^5 CFU/mL and 1.5×10^5 CFU/mL, respectively. After 48 hours injection challenge, infected fish showed clinical signs such as lethargic, hemorrhage on the skin and base of fins, protruding and hemorrhage eyes. Mortality started at 72 hours post challenge and the cumulative mortality of fish infected with HTA1 and HTA3 strains at day 8 post challenge was the highest (76,7% and 80%, respectively). Whereas, in the control group, uninfected fish showed no clinical sign, no death, and no *S. iniae* were found.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định một số đặc điểm bệnh học của vi khuẩn *Streptococcus iniae* phân lập từ cá chẽm (*Lates calcarifer*) nuôi trong lồng tại Thừa Thiên Huế. Kết quả có 27 chủng vi khuẩn được phân lập từ 50 mẫu cá chẽm bị bệnh xuất huyết và được định danh là *S. iniae* bằng phương pháp sinh hóa. Các chủng vi khuẩn này có dạng hình cầu, Gram dương, phản ứng oxidase và catalase âm tính, không di động, có khả năng thủy phân tinh bột và esculin, không thủy phân hippurate. Kết quả xác định kiểu huyết thanh bằng phương pháp ngưng kết miễn dịch sử dụng kit Slidex Strepto Plus cho thấy 27 chủng vi khuẩn phân lập được đều âm tính với 6 kiểu huyết thanh A, B, C, D, F, G của nhóm Lancefield. Hai chủng *S. iniae* (HTA1 và HTA3) được chọn để kiểm tra khả năng gây bệnh thực nghiệm và xác định giá trị LD50. Giá trị LD50 của 2 chủng HTA1 và HTA3 lần lượt là $1,9 \times 10^5$ CFU/mL và $1,5 \times 10^5$ CFU/mL. Sau 48 giờ cảm nhiễm với 2 chủng HTA1 và HTA3 cá chẽm thí nghiệm có dấu hiệu bệnh lý như bơi lơ đờ trên mặt nước, xuất huyết trên da và gốc vây, mắt lồi và xuất huyết. Sau 72 giờ thí nghiệm, cá bắt đầu chết và đạt tỉ lệ chết tích lũy cao nhất sau 8 ngày cảm nhiễm với tỉ lệ chết tích lũy là 76,7% (HTA1) và 80% (HTA3). Trong khi đó ở lô đối chứng, cá không thể hiện dấu hiệu bệnh lý, không chết cũng như không phân lập được vi khuẩn *S. iniae*.

Trích dẫn: Trương Thị Hoa, Nguyễn Ngọc Phước và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2018. Nghiên cứu đặc điểm bệnh học của vi khuẩn *Streptococcus iniae* trên cá chẽm (*Lates calcarifer*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(3B): 156-163.

1 GIỚI THIỆU

Bệnh do *Streptococcus iniae* được báo cáo ở nhiều loài cá nước ngọt và cá biển ở 15 quốc gia khác nhau thuộc 4 châu lục, gồm châu Phi, châu Á, châu Úc và châu Âu. Bệnh đã và đang là mối đe dọa cho nhiều loài cá nuôi ở cả môi trường nước mặn, lợ và nước ngọt (Hossain *et al.*, 2014).

Trên cá chêm *Lates calcarifer*, bệnh do *S. iniae* được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1999 tại Úc (Bromage *et al.*, 1999), sau đó bệnh tiếp tục xuất hiện trên cá chêm nuôi tại Úc năm 2006 (Creper and Buller, 2006), tại Thái Lan năm 2010 (Suanyuk *et al.*, 2010). Tại Việt Nam, bệnh do *S. iniae* gây ra trên cá chêm được báo cáo đầu tiên vào năm 2013 (Tran Vi Hich *et al.*, 2013).

Bệnh do *S. iniae* trên cá chêm gây xuất huyết trên da, vây và mắt lồi đục (Bromage *et al.*, 1999). Một số dấu hiệu khác như lở loét ngoài da hay xuất huyết ở các gốc vây, nắp mang, hậu môn đã được quan sát trên cá chêm và cá rô phi nhiễm *S. iniae* (Suanyuk *et al.*, 2010). Bệnh do *S. iniae* có thể gây ra tỷ lệ chết lên đến 70% ở giai đoạn cá chêm giống (Creper and Buller, 2006). Ở Việt Nam, bệnh do *S. iniae* được báo cáo xuất hiện đầu tiên trên cá chêm nuôi tại Khánh Hòa và gây chết cá vào năm 2008 (Tran Vi Hich *et al.*, 2013). Tại Thừa Thiên Huế, từ năm 2007, để hạn chế dịch bệnh và ô nhiễm môi trường do nuôi thâm canh tôm thẻ chân trắng gây ra, tỉnh đã phát triển nuôi các đối tượng cá nước mặn, lợ như cá mú, cá hồng, cá diá, cá chêm..., để thay thế các vùng diện tích nuôi tôm bị dịch bệnh. Trong đó, cá chêm được người dân địa phương nuôi khá phổ biến và mang lại hiệu quả kinh tế cao (Tôn Thất Chất và *ctv.*, 2010). Tuy nhiên, việc mở rộng diện tích mặt nước để nuôi cá chêm thiếu quy hoạch chặt chẽ đã làm nghề nuôi cá gặp rất nhiều khó khăn về môi trường và dịch bệnh, trong đó bệnh xuất huyết trên cá chêm rất phổ biến. Theo báo cáo của Chi cục Nuôi trồng Thủy sản Thừa Thiên Huế (2010), dịch bệnh xuất huyết đã làm cá chêm giai đoạn giống chết hàng loạt, cá thịt có hiện tượng sinh trưởng chậm, xuất huyết trên da, mắt lồi và xuất huyết, cá chết rải rác. Trong vụ nuôi năm 2014, hiện tượng cá chêm chết với dấu hiệu xuất huyết trên cơ thể được báo cáo ở vùng nuôi cá chêm tại Thừa Thiên Huế. Dịch bệnh đã gây tổn thất rất lớn cho nghề nuôi cá chêm (Chi cục Nuôi trồng Thủy sản Thừa Thiên Huế, 2014). Do đó, nghiên cứu đặc điểm bệnh học của bệnh xuất huyết do *S. iniae* trên cá chêm nhằm xác

định các đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn *S. iniae* và đặc điểm của bệnh xuất huyết do *S. iniae* gây ra, góp phần hạn chế tác hại của bệnh trên cá chêm nuôi tại Thừa Thiên Huế.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Cá chêm được thu tại 5 lồng nuôi ở Thừa Thiên Huế (mỗi lồng thu 10 con), cá có dấu hiệu xuất huyết trên da, mắt cá bị lồi, mờ đục và xuất huyết. Tổng số mẫu cá chêm bị bệnh xuất huyết được thu để nghiên cứu là 50 con.

Cá chêm giống để bố trí thí nghiệm được cung cấp từ trại cá giống Vân Nam, tỉnh Thừa Thiên Huế. Cá có chiều dài từ 6 – 7 cm và khối lượng dao động từ 5,3 – 7,8 g/con.

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn: *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Merck, Đức), *Tryptone Soya Broth* (TSB) (Merck, Đức), kit API 20Strep (BioMerieux, Pháp), thuốc nhuộm Gram và kit định danh vi khuẩn Gram (+) (Nam Khoa, Việt Nam), bộ kit Slidex Strepto Plus (BioMerieux, Pháp).

2.2 Phân lập và định danh vi khuẩn

Tiến hành thu mẫu cá chêm bị bệnh xuất huyết tại các lồng nuôi. Cá được vận chuyển trong thùng xốp về phòng thí nghiệm để phân lập vi khuẩn. Sát trùng bên ngoài cơ thể cá bằng cồn 70°, dùng dao mổ và kéo tiết trùng để mổ cá, mô tả các dấu hiệu bệnh lý bên trong. Lấy mẫu vi khuẩn ở tim, gan, thận, lách và não nuôi cấy trên môi trường TSA bổ sung thêm 1,5% NaCl. Nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C và kiểm tra sự phát triển của khuẩn lạc sau 24 đến 48 giờ. Các khuẩn lạc rời, nằm trên đường cấy được chuyển sang môi trường nuôi tương tự để phát triển thành các dòng thuần. Sử dụng bộ nhuộm Gram dương (Nam Khoa, Việt Nam) để xác định hình dạng vi khuẩn. Sử dụng bộ test định danh vi khuẩn Gram dương (Nam Khoa, Việt Nam) để xác định các phản ứng catalase, oxidase, huyết tương thỏ đông khô, 6,5% NaCl, lysin decarboxylase và bile esculine. Xác định khả năng gây tan huyết của vi khuẩn trên môi trường thạch máu (Blood Agar). Kiểu huyết thanh được xác định bằng phương pháp ngưng kết miễn dịch theo phương pháp của Lancefield bằng bộ kit Slidex Strepto Plus (BioMerieux, Pháp). Sử dụng bộ kit API 20 Strep (BioMerieux, Pháp) để định danh vi khuẩn phân lập được theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Hình 1).



Hình 1: Bộ test sinh hóa định danh vi khuẩn

A- Bộ test sinh hóa định danh vi khuẩn Gram (+) của Công Ty Nam Khoa, Việt Nam; B-Kit API 20 Strep của BioMerieux, Pháp; C- Kit Slidex Strepto Plus (BioMerieux, Pháp)

Các chủng vi khuẩn *S. iniae* sau khi định danh được lưu giữ trong môi trường TSB bổ sung thêm 1,5% NaCl và 20% glycerol, bảo quản ở -80°C.

2.3 Phương pháp xác định khả năng gây bệnh thực nghiệm của vi khuẩn

2.3.1 Chuẩn bị cá thí nghiệm

Cá thí nghiệm ở giai đoạn giống, có chiều dài từ 6 – 7 cm, khối lượng từ 5,3 – 7,8 g/con được cung cấp từ trại sản xuất giống Vân Nam, xã Phú Thuận, huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế. Cá khỏe mạnh, được nuôi giữ trong bể composite. Cá được nuôi trong điều kiện thí nghiệm 14 ngày để quen với môi trường thí nghiệm và được cho ăn bằng thức ăn Nanolis C (Ocialis, Việt Nam) 1 lần/ngày theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3.2 Chuẩn bị vi khuẩn thí nghiệm

Lấy khuẩn lạc *S. iniae* trên môi trường TSA có bổ sung 1,5% NaCl cho vào ống falcon (50 mL) có chứa 20 mL TSB bổ sung 1,5% NaCl, ủ lắc ở nhiệt độ 28°C trong buồng cấy Shaking incubator (LM-4200, Yinder, Trung Quốc) trong 24 giờ. Tiến hành ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút (Lab Centrifuge, Digisystem Laboratory, Đức), loại bỏ phần dung dịch phía trên, sau đó bổ sung nước muối sinh lý (0,85% NaCl) tạo dung dịch huyền phù. Lấy 1 mL huyền phù vi khuẩn đo mật độ quang (OD - Optical Density) bằng máy so màu quang phổ (411RS, Zuzi, Đức) ở bước sóng 600 nm. Pha loãng cho đến giá trị OD của huyền phù đo được bằng 1. Lấy dịch huyền phù này tiến hành pha loãng từ 10⁻² đến 10⁻⁴ và xác định mật độ vi khuẩn theo phương pháp đếm khuẩn lạc (Miles *et al.*, 1938).

2.3.3 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Xác định độc lực vi khuẩn

Thí nghiệm được bố trí trong hệ thống bể nhựa, mỗi bể có thể tích 80L chứa 50L nước biển sạch có sục khí. Bố trí 27 nghiệm thức với 27 chủng vi khuẩn *S.iniae*, mỗi nghiệm thức bố trí 1 bể với 10 cá chēm giống. Tiêm 0,1 mL dịch huyền phù mỗi chủng vi khuẩn với mật độ 10⁹CFU/mL vào xoang bụng của cá. Nghiệm thức đối chứng tiêm 0,1 mL

nước muối sinh lý. Kiểm tra cá 4 lần/ngày để theo dõi số cá chết và xác định những chủng vi khuẩn gây chết cá trong 3 ngày. Tiến hành phân lập lại vi khuẩn từ não và thận cá. Những chủng vi khuẩn *S. iniae* gây chết cá trong 3 ngày thí nghiệm được xem là những chủng có độc lực và được sử dụng cho thí nghiệm 2.

Thí nghiệm 2: Xác định liều gây chết 50% (LD50 - Lethal dose 50)

Thí nghiệm xác định liều gây chết 50% được tiến hành theo phương pháp Reed and Muench (1938). Hai chủng *S. iniae* gây chết cá (tỉ lệ chết 100%) ở thí nghiệm 1 (HTA1 và HTA3) được sử dụng để xác định LD50. Mỗi chủng vi khuẩn được bố trí với 5 nghiệm thức và 3 lần lặp. Thí nghiệm được bố trí trong hệ thống bể nhựa có thể tích 80L chứa 50L nước biển sạch có sục khí, mỗi bể bố trí 10 cá chēm giống. Cá chēm ở 4 nghiệm thức thí nghiệm được tiêm 0,1 mL dung dịch huyền phù vi khuẩn vào xoang bụng với mật độ vi khuẩn trong dịch huyền phù tăng dần từ 10⁴ CFU/mL ở nghiệm thức 1 cho đến 10⁷ CFU/mL ở nghiệm thức 4. Ở nghiệm thức đối chứng, cá được tiêm 0,1 mL nước muối sinh lý. Thí nghiệm được tiến hành trong 14 ngày, kiểm tra cá 4 lần/ngày để theo dõi số lượng cá chết.

Liều gây chết 50% được xác định dựa trên tỉ lệ chết tích lũy ở từng nghiệm thức sau khi kết thúc thí nghiệm. Dựa vào số lượng cá chết ở các nghiệm thức để tính LD50 theo công thức sau:

$$LD50 = 10^{a-x}$$

Trong đó: a là số lũy thừa mà tại đó vi khuẩn gây chết cá thấp nhất (trên 50%)

x được tính dựa vào công thức: $x = (P_a - 50)/(P_a - P_u)$

Với: P_a là tỉ lệ cận trên và P_u là tỉ lệ cận dưới của nồng độ gây chết 50%.

Thí nghiệm 3: Xác định khả năng gây bệnh thực nghiệm của vi khuẩn

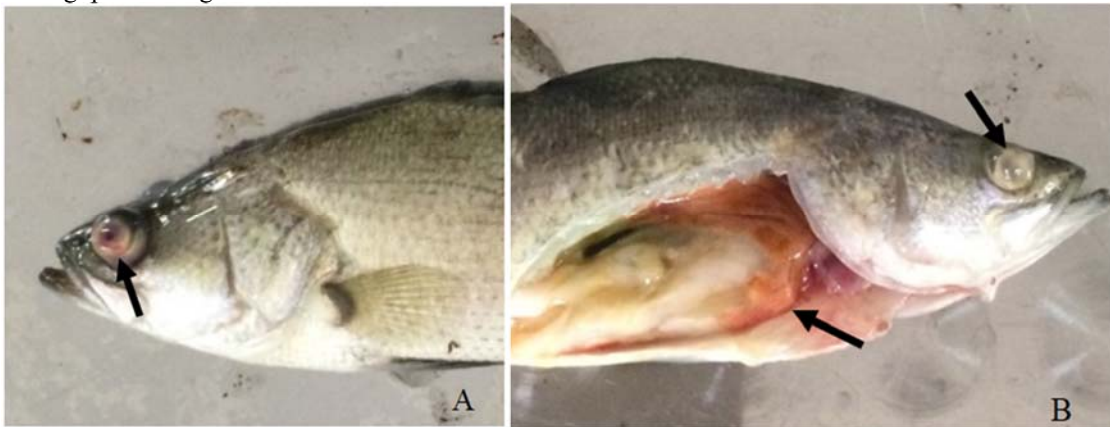
Thí nghiệm được bố trí trong hệ thống bể nhựa, mỗi bể có thể tích 80L chứa 50L nước biển sạch có sục khí. Thí nghiệm được bố trí với 3 nghiệm thức và 3 lần lặp, mỗi nghiệm thức bố trí 3 bể với 10 cá chẽm giống/bể. Hai nghiệm thức thí nghiệm với hai chủng HTA1 và HTA3 được tiêm 0,1 mL dịch huyền phù vi khuẩn với mật độ là giá trị LD50 từ thí nghiệm 2 vào xoang bụng cá. Nghiệm thức đối chứng tiêm 0,1 mL nước muối sinh lý. Thí nghiệm được tiến hành trong 14 ngày, kiểm tra cá 4 lần/ngày để theo dõi tình trạng sức khỏe của cá và thu những cá có dấu hiệu bệnh lý để phân lập lại vi khuẩn.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn *Streptococcus iniae* trên cá chẽm

Trong quá trình nghiên cứu đã thu 50 cá chẽm

nuôi lồng tại Thừa Thiên Huế bị bệnh xuất huyết. Cá bơi lơ đờ, có dấu hiệu xuất huyết trên da, mắt cá bị lồi, mờ đục và xuất huyết, xoang bụng tích dịch (Hình 2). Cá có chiều dài dao động từ 10 - 38 cm và khối lượng từ 26 - 747 g. Kết quả phân lập vi khuẩn từ gan, lách, thận, não, tim các mẫu cá chẽm bị bệnh xuất huyết, đã xác định được 27 chủng vi khuẩn *Streptococcus* spp. Các chủng *Streptococcus* spp. được phân lập từ não, lách và thận của cá chẽm, trong đó có 17 chủng phân lập từ não (63%), 6 chủng ở thận (22,2%) và 4 chủng ở lách (14,8%). Kết quả này cho thấy các chủng *Streptococcus* spp. được phân lập chủ yếu từ não, thận và lách cá chẽm. Tương tự với kết quả nghiên cứu của Bromage *et al.* (1999), tỷ lệ của các chủng vi khuẩn *S. iniae* phân lập từ não, thận và lách cá chẽm lần lượt là 100%; 92% và 50%.

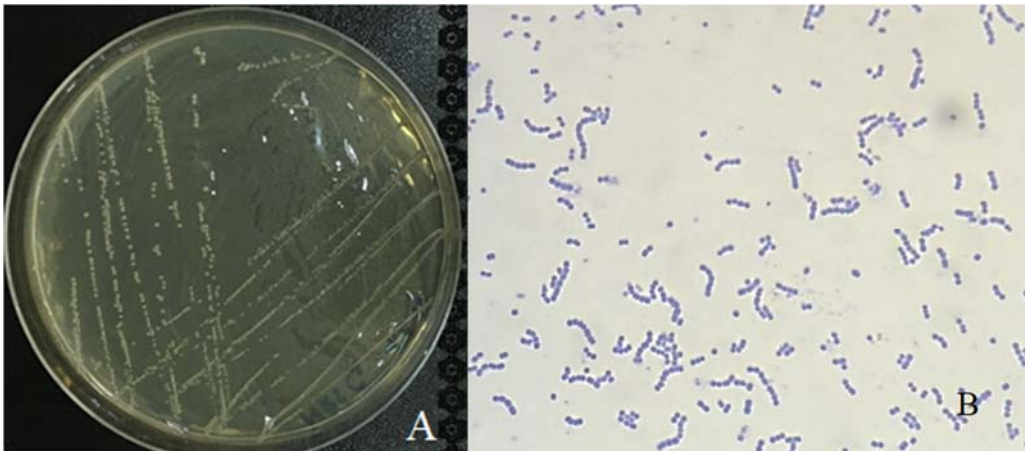


Hình 2: Cá chẽm bị bệnh xuất huyết thu tại Thừa Thiên Huế

A- mắt cá bị lồi và xuất huyết (mũi tên); B- mắt lồi và mờ đục, nội quan tích dịch (mũi tên)

Kết quả thu mẫu nuôi cấy phân lập vi khuẩn cho thấy trên môi trường TSA bổ sung 1,5% NaCl, sau 48 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C, hình thành những

vi khuẩn lạc nhỏ, màu trắng đục, không sinh sắc tố. Kết quả nhuộm Gram xác định vi khuẩn Gram (+), có dạng hình cầu hoặc liên cầu (Hình 3).



Hình 3: Hình dạng khuẩn lạc và vi khuẩn *S. iniae*

A- Hình dạng khuẩn lạc *S. iniae* trên môi trường TSA bổ sung 1,5% NaCl; B - Hình dạng vi khuẩn *S. iniae* sau khi nhuộm Gram (x100)

Kết quả nghiên cứu các đặc điểm sinh hóa cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập được đều không di động, catalase và oxidase âm tính, không mọc trên môi trường TSB bổ sung 6,5% NaCl, âm tính với phản ứng lysin decarboxylase, dương tính với phản ứng bile esculin, huyết tương thô đông khô và thủy phân tinh bột. Kết quả xác định kiểu huyết thanh bằng phương pháp ngưng kết miễn dịch sử dụng bộ kit Slidex Strepto Plus cho thấy 27 chủng vi khuẩn phân lập được đều âm tính với 6 kiểu huyết thanh A, B, C, D, F, G của nhóm Lancefield. Trên môi trường thạch máu (Blood Agar - BA), vi khuẩn lạc tạo vòng dung huyết β. Kết quả định danh bằng kit API 20 Strep cho thấy tất 27 chủng *Streptococcus* spp. thủy

phân esculin và không thủy phân hippurate, các phản ứng pyrrolidonylarylamidase, β-Glucuronidase, alkaline phosphatase, arginine dihydrolase dương tính, phản ứng Voges-Proskauer, α-Galactosidase, β-Galactosidase âm tính (Bảng 1). Dựa vào các chỉ tiêu sinh hóa, 27 chủng phân lập được định danh là *S. iniae*. Kết quả nghiên cứu ghi nhận đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn *S. iniae* phân lập trên cá chêm bị bệnh xuất huyết nuôi tại tỉnh Thừa Thiên Huế có sự tương đồng với các chủng *S. iniae* phân lập trên cá chêm (Bromage *et al.*, 1999); Tran Vi Hich *et al.*, 2013); trên cá heo (Pier and Madin, 1976), trên cá hồng mỹ (Mmanda *et al.*, 2014) và trên cá tráp (Aamri *et al.*, 2015).

Bảng 1: Đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được từ cá chêm nuôi tại Thừa Thiên Huế và so với chủng *S. iniae* của Bromage *et al.* (1999)

Chỉ tiêu theo dõi	<i>S. iniae</i> (Bromage <i>et al.</i> , 1999)	Tỷ lệ % chủng vi khuẩn phân lập (n=27)	
		Dương tính	Âm tính
Nhuộm Gram	+	100	
Hình dạng	Hình cầu	100	
Oxidase	-		100
Catalase	-		100
Di động	-		100
Gây tan huyết dạng β	+	100	
Huyết tương thô đông khô	ND	100	
Lysin decarboxylase	ND		100
Bile esculin	ND	100	
Growth at 10°C	+	100	
45°C	-		100
Growth in TSB 6,5% NaCl	-		100
Growth in TSA 0% NaCl	-		100
Hydrolysis of starch	+	100	
Lancefield's group	ND		100
Voges-Proskauer	-		100
Hydrolysis of Hippurate	-		100
Hydrolysis of Esculin	+	100	
Pyrrolidonylarylamidase	+	100	
α-Galactosidase	-		100
β-Glucuronidase	+	100	
β-Galactosidase	-		100
Alkaline phosphatase	+	100	
Leucine arylamidase	+	100	
Arginine dihydrolase	+	100	
Ribose	+	81,5	18,5
Arabinose	-	7,4	92,6
Mannitol	+	77,8	22,2
Sorbitol	-		100
Lactose	-	3,7	96,3
Trehalose	+	100	
Inulin	ND	29,6	70,4
Raffinose	-	3,7	96,3
Amygdalin	ND	11,1	88,9
Glycogen	ND	25,9	74,1

Ghi chú: “+”: phản ứng dương tính; “-”: phản ứng âm tính; ND: không thực hiện

3.2 Khả năng gây bệnh thực nghiệm của *S. iniae* trên cá chêm

3.2.1 Kết quả xác định LD50 của *S. iniae* trên cá chêm

Kết quả thí nghiệm xác định độc lực của 27 chủng vi khuẩn *S. iniae* trên cá chêm cho thấy có 2 chủng gây chết cá trong 3 ngày thí nghiệm là HTA1 và HTA3, đây là 2 chủng được phân lập từ não cá chêm bị bệnh xuất huyết. Giá trị LD50 của 2 chủng HTA1 và HTA3 bằng cách tiêm vào xoang bụng cá chêm lần lượt là $1,9 \times 10^5$ CFU/mL và $1,5 \times 10^5$

CFU/mL (Bảng 2). Nồng độ gây chết của vi khuẩn tùy thuộc vào sự miễn cảm khác nhau của từng loài cá (Agnew and Barnes, 2007). Khi tiến hành nghiên cứu nồng độ gây chết của vi khuẩn *S. iniae* trên cá chêm của Tran Vi Hich *et al.* (2013), đã xác định được LD50 là $1 \times 10^{5,8}$ CFU/mL; tương tự với kết quả nghiên cứu của Mmanda *et al.* (2014), LD50 trên cá hồng mỹ là $9,6 \times 10^6$ CFU/mL, trên cá rô phi $3,18 \times 10^5$ CFU/mL (Perera *et al.*, 1997), trên cá rô đồng 1×10^6 CFU/mL (Từ Thanh Dung và *ctv.*, 2013).

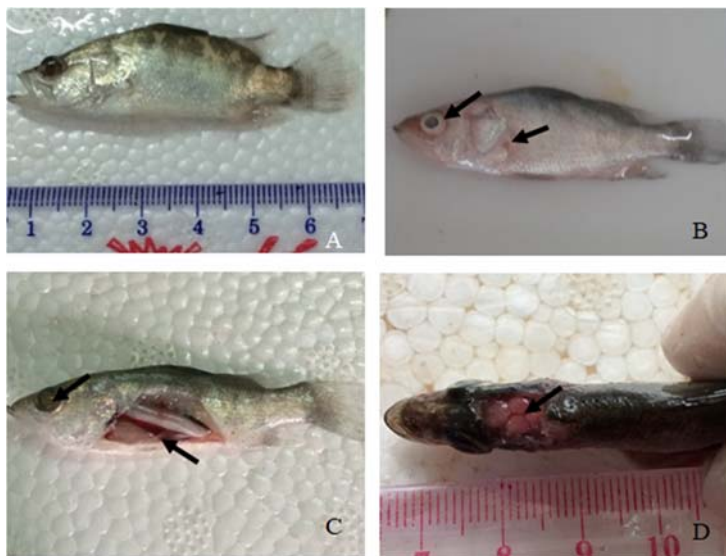
Bảng 2: Kết quả thí nghiệm xác định LD50 của hai chủng vi khuẩn *S. iniae* HTA1 và HTA3

Chủng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)	Số cá thí nghiệm (con)	Số cá chết (con)	Số cá sống (con)	Số cá chết cộng dồn (con)	Số cá sống cộng dồn (con)	Tỷ lệ chết (%)	Giá trị LD50 (CFU/mL)
HTA1	10^7	10	9	1	22	1	95,7	$1,9 \times 10^5$
	10^6	10	6	4	13	5	72,2	
	10^5	10	5	5	7	10	41,2	
	10^4	10	2	8	2	18	10	
HTA3	10^7	10	10	0	23	0	100	$1,5 \times 10^5$
	10^6	10	7	3	13	3	81,3	
	10^5	10	5	5	6	8	42,9	
	10^4	10	1	9	1	17	5,6	

3.2.2 Kết quả gây bệnh thực nghiệm

Kết quả gây bệnh thực nghiệm 2 chủng HTA1 và HTA3 trên cá chêm làm cá xuất hiện các dấu hiệu

bệnh lý tương tự với cá chêm bị bệnh xuất huyết thu tại các lồng nuôi. Sau 48 giờ cảm nhiễm *S. iniae* cá bị xuất huyết trên da, lồi mắt, xoang bụng tích dịch, não bị xuất huyết (Hình 4).



Hình 4: Cá chêm trước và sau thí nghiệm xác định khả năng gây bệnh thực nghiệm với chủng *S. iniae*

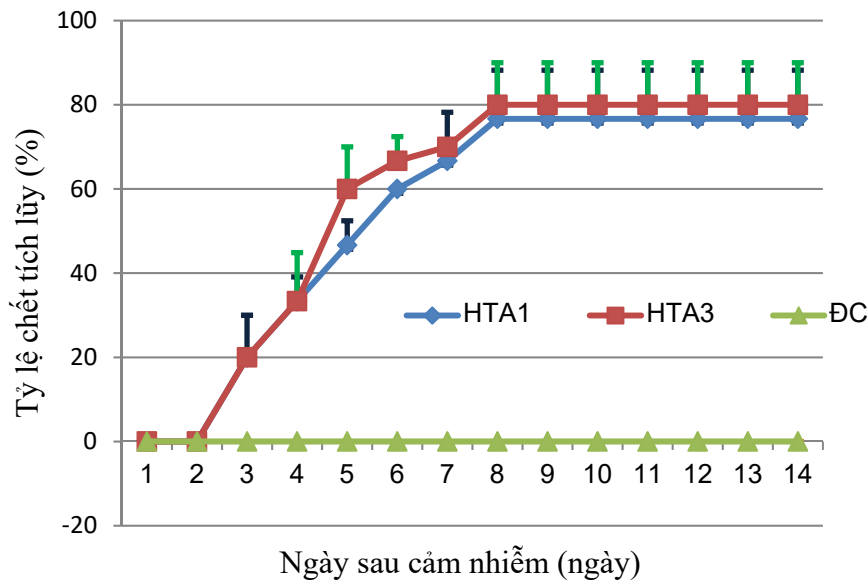
A-Cá chêm khỏe đưa vào thí nghiệm; B-Mắt cá bị lồi đục, da bị xuất huyết (mũi tên); C-Mắt lồi đục (mũi tên), xoang bụng cá tích dịch (mũi tên); D-Não cá bị xuất huyết (mũi tên)

Kết quả thu 10 mẫu cá chêm bị bệnh xuất huyết (05 mẫu/nghiệm thức thí nghiệm) để tái phân lập và định danh vi khuẩn gây bệnh xuất huyết ở 02 nghiệm thức thí nghiệm cho thấy khi lấy mẫu ở não nuôi cấy

vi khuẩn trên môi trường TSA bổ sung thêm 1,5% NaCl sau 48 giờ hình thành các khuẩn lạc nhỏ, hình tròn, màu trắng đục. Trong khi đó ở nghiệm thức đối chứng không phân lập được vi khuẩn gây bệnh từ

nào cá. Tiến hành kiểm tra các đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được ở 02 nghiệm thức thí nghiệm cho thấy chúng là các vi khuẩn Gram (+), hình cầu hoặc liên cầu, không di động, âm tính với oxidase và catalase, dương tính với huyết tương thô đông khô. Kết quả định danh bằng bộ kit API 20 Strep, các chủng vi khuẩn phân

lập được trên cá chẽm bị bệnh xuất huyết ở 02 nghiệm thức thí nghiệm là *S. iniae*. Kết quả này cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập được có đặc điểm sinh hóa tương tự với các chủng *S. iniae* HTA1 và HTA3 gây cảm nhiễm và tương đồng với các chủng *S. iniae* phân lập trên cá chẽm bị bệnh xuất huyết nuôi tại Thừa Thiên Huế.



Hình 5: Tỷ lệ chết của cá chẽm sau 14 ngày cảm nhiễm hai chủng *S. iniae* HTA1 và HTA3

Kết quả theo dõi tỷ lệ chết tích lũy của cá chẽm ở thí nghiệm xác định khả năng gây bệnh thực nghiệm của hai chủng HTA1 và HTA3 cho thấy cá chết sau 72 giờ cảm nhiễm và tỷ lệ chết ở 2 nghiệm thức thí nghiệm là 20%. Sau 8 ngày thí nghiệm, tỷ lệ chết tích lũy của cá chẽm cảm nhiễm hai chủng HTA1 và HTA3 cao nhất, lần lượt là 76,7% và 80%, đến ngày thứ 9, không xuất hiện cá chết ở 2 lô thí nghiệm. Trong khi đó, cá ở lô đối chứng không xuất hiện dấu hiệu bệnh lý và không chết sau 14 ngày thí nghiệm (Hình 5). Kết quả này tương tự với thí nghiệm trước đây của Bromage *et al.* (1999) khi gây cảm nhiễm *S. iniae* trên cá chẽm với mật độ $2,5 \times 10^5$ CFU/mL, cá bị xuất huyết và chết sau 48 giờ cảm nhiễm, tỷ lệ chết tích lũy cao nhất là 80% sau 4 ngày. Tương tự, nghiên cứu của Aamri *et al.* (2010) cho thấy khi cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae* trên cá tráp với mật độ 10^8 CFU/mL, cá có biểu hiện bơi lờ đờ, xuất huyết trên da, mắt lồi đục và chết sau 72 giờ cảm nhiễm, tỷ lệ chết tích lũy cao nhất là 50% sau 10 ngày thí nghiệm.

4 KẾT LUẬN

Vi khuẩn *S. iniae* gây bệnh xuất huyết trên cá chẽm nuôi tại Thừa Thiên Huế. Cá bệnh bị xuất huyết trên da, mắt lồi đục và xuất huyết, xoang bụng tích dịch, não xuất huyết. Kết quả xác định giá trị

LD50 của 2 chủng *S. iniae* HTA1 và HTA3 trên cá chẽm giống lần lượt là $1,9 \times 10^5$ CFU/mL và $1,5 \times 10^5$ CFU/mL. Kết quả gây bệnh thực nghiệm ghi nhận tỷ lệ chết tích lũy của cá chẽm cảm nhiễm 2 chủng HTA1 và HTA3 cao nhất, lần lượt là 76,7% và 80%.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn Trường Đại học Nông Lâm Huế và dự án VLIR - Network – Việt Nam đã tài trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aamri, F.E., Caballero, M.J., Real, F., Acosta, F., Deniz, S., Roman, F. and Padilla, D., 2015. *Streptococcus iniae* in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*, L.) and Red Porgy (*Pagrus pagrus*, L.): Ultrastructural Analysis. *Veterinary Pathology*. 52(1): 209-212.
- Agnew, W. and Barnes, A.C., 2007. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*. 122(2): 1-15.
- Bromage, E.S., Thomas, A. and Owens, L., 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Diseases of Aquaculture Organisms*. 36(3):177-181.

- Creeper, J.H. and Buller, N.B., 2006. An outbreak of *Streptococcus iniae* in barramundi (*Lates calcarifer*) in freshwater cage culture. *Australian Veterinary Journal*. 84(11): 408–411.
- Hich, T.V., Quyen, V.D.H., Dung, N.H. and Wergeland, H.I., 2013. Experimental *Streptococcus iniae* infection in barramundi (*Lates calcarifer*) cultured in Vietnam. *International Journal of Aquatic Science*. 4(1): 3-12.
- Hossain, M., Mosharraf, M., Ehsan, A., Rahman, M.A., Haq, M., Bazlur, M. and Chowdhury, R., 2014. Transmission and pathology of *Streptococcus iniae* in monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in aquaculture of Bangladesh. *Journal of Fisheries*. 2(1): 90-99.
- Miles, A., Misra, S. and Irwin, J., 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*. 38(6):732-749
- Mmanda, F.P., Zhou, S., Zhang, J., Zheng, X., An, S. and Wang, G., 2014. Massive mortality associated with *Streptococcus iniae* infection in cage-cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) in Eastern China. *African Journal of Microbiology Research*. 8(16): 1722 – 1729.
- Perera, R.P., Johnson, S.K., Collins, M.D. and Lewis, D.H., 1994. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *T. aurea* hybrids. *Journal of Aquatic Animal Health*. 6(4): 335-340.
- Pier, G.B. and Madin, S.H., 1976. *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic *Streptococcus* isolated from Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 26(4): 545- 553.
- Reed, L.J. and Muench, H.A., 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 27(3): 493-497.
- Chi cục Nuôi trồng Thủy sản Thừa Thiên Huế, 2010. Quyết định số 86/BC-CCNTTS, ngày 28/12/2010. Báo cáo tổng kết tình hình nuôi trồng thủy sản tỉnh Thừa Thiên Huế.
- Chi cục Nuôi trồng Thủy sản Thừa Thiên Huế, 2014. Quyết định số 112/BC-CCNTTS, ngày 25/12/2014. Báo cáo tổng kết tình hình nuôi trồng thủy sản tỉnh Thừa Thiên Huế.
- Suanyuk, N., Sukkasame, N., Tanmark, N., Yoshida, N., Itami, T., Thune, R.L., Tantikitti C. and Supamattaya, K., 2010. *Streptococcus iniae* infection in cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and red tilapia (*Oreochromis sp.*) in southern Thailand. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 32(4): 341-348.
- Tôn Thất Chất, Lê Tất Uyên Châu, Nguyễn Thị Thúy Hằng, Nguyễn Tý, 2010. Kết quả điều tra tình hình nuôi cá vược ở vùng đầm phá tỉnh Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Nghiên cứu và Phát triển*. 4(81): 105-110
- Từ Thanh Dung, Huỳnh Thị Ngọc Thanh và Nguyễn Khương Duy, 2013. *Streptococcus iniae*, tác nhân gây bệnh “đen thân” trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*). *Tạp chí khoa học, Đại học Cần Thơ*. 26b: 96-103.