

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC ĐIỂM CỦA VI KHUẨN *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* TỪ CÁ ĐIỀU HỒNG (*OREOCHROMIS* SP.) BỆNH PHÙ MẮT VÀ XUẤT HUYẾT

Đặng Thị Hoàng Oanh¹ và Nguyễn Thanh Phương¹

ABSTRACT

Diseased specimens that have a symptom as popeye and skin haemorrhage were collected at a farm practicing intensive cage culture of red tilapia in Tien Giang province. Microscopic observation of fresh smear of blood and kidney from these specimens revealed small cocci, gram positive bacterial cells. Bacteria isolates from brain and head kidney were recovered on brain heart agar and were analyzed as Gram positive, non-motile and oxidase negative and they were identified as Streptococcus agalactiae biotype 2 using a combination of conventional biochemical tests, API 20 strep system and slide agglutination method. Challenge experiments using injection method showed that they can cause the observed disease signs with the LD₅₀ value of about 4,89 x 10⁴ CFU/ml. Histopathological examination of diseased specimens showed a typical sign of bacterial necrosis in kidney, spleen and liver. It is the first report of S. agalactiae biotype 2 outbreak in tilapia in Vietnam.

Keywords: Red tilapia, *Streptococcus agalactiae*, pathogenicity

Title: Isolation and characterization of *Streptococcus agalactiae* from red tilapia cultured in the Mekong Delta of Vietnam

TÓM TẮT

Mẫu cá điều hồng bệnh phù mắt và xuất huyết được thu từ những bè nuôi cá điều hồng thâm canh ở Tiền Giang. Quan sát bằng kính hiển vi tiêu bản nhuộm Gram mẫu phết máu và thận của cá bệnh thấy có vi khuẩn hình cầu, Gram dương. Vi khuẩn phân lập từ não và thận trước của cá mọc trên môi trường brain heart agar cũng là vi khuẩn Gram dương, không di động, oxidase âm tính. Vi khuẩn được định danh là *Streptococcus agalactiae* týp 2 bằng phương pháp sinh hóa, kit API 20 strep và phương pháp ngưng kết miễn dịch. Thí nghiệm cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm cho thấy vi khuẩn có khả năng gây bệnh với dấu hiệu bệnh lý giống như khi thu mẫu với giá trị LD₅₀ khoảng 4,89 x 10⁴ CFU/ml. Kết quả phân tích mô bệnh học các mẫu cá bệnh cho thấy các hiện tượng hoại tử đặc trưng do nhiễm khuẩn ở gan, thận và tỳ tạng. Đây là báo cáo đầu tiên về bệnh do *S. agalactiae* týp 2 trên cá điều hồng nuôi ở Việt Nam.

Từ khóa: Cá điều hồng, *Streptococcus agalactiae*, độc lực

1 GIỚI THIỆU

Cá điều hồng (*Oreochromis* sp) là một trong những đối tượng thủy sản đang được nuôi phổ biến ở nước ta, là đối tượng dễ nuôi, có chất lượng thịt ngon và giá trị dinh dưỡng cao nên được nhiều người ưa chuộng. Cá được nuôi phổ biến ở các tỉnh như Long An, An Giang, Đồng Tháp, Cần Thơ, Vĩnh Long và Tiền Giang. Cá điều hồng hiện nay được nuôi chủ yếu trong bè với mật độ thả nuôi rất cao và số lượng bè nuôi ngày một tăng. Tuy nhiên việc mở rộng diện tích và sự thâm canh

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

hóa nghề nuôi cá điêu hồng cũng không thể tránh khỏi tình trạng dịch bệnh xảy ra ngày càng nhiều và gây thiệt hại ngày càng nghiêm trọng. Bệnh phổ biến và gây thiệt hại nghiêm trọng trong mô hình nuôi cá điêu hồng thâm canh là bệnh do nhóm vi khuẩn thuộc giống *Streptococcus*. Dấu hiệu bệnh lý thường gặp ở cá điêu hồng nhiễm vi khuẩn *Streptococcus* thường là phù mắt hay lồi mắt, xuất huyết trên thân. Bệnh được ghi nhận đã xuất hiện và làm chết cá rải rác ở một số cơ sở nuôi bè tại An Giang đầu tiên vào 2004. Thời gian gần đây bệnh cũng xuất hiện nhiều ở các vùng nuôi cá điêu hồng trên bè thuộc các tỉnh Vĩnh Long và Tiền Giang. Bệnh xuất hiện hầu hết các tháng trong mùa mưa (từ tháng 7 đến tháng 10) và các tháng giao mùa tỉ lệ chết cao gây thiệt hại nghiêm trọng. Khi dịch bệnh xảy ra thì việc điều trị bệnh là rất khó khăn.

Streptococcus là vi khuẩn hình cầu, Gram âm, rất đa dạng về thành phần loài và kiểu huyết thanh nên dễ nhầm lẫn với những nhóm cầu khuẩn khác về kiểu hình và đặc tính sinh lý, sinh hóa. Do đó, việc xác định tác nhân gây bệnh xuất huyết ở cá không thể chỉ dựa vào dấu hiệu bệnh lý bên ngoài mà phải kết hợp với những xét nghiệm đặc hiệu thì mới có cơ sở để xác định chính xác về tác nhân gây bệnh và từ đó mới có thể có kế hoạch phòng trị bệnh hiệu quả. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả phân lập, đặc điểm sinh hóa, kiểu huyết thanh và khả năng gây bệnh của vi khuẩn *S. agalactiae* týp 2 ở cá điêu hồng nhằm cung cấp thông tin cho việc phòng trị hiệu quả bệnh vi khuẩn ở đối tượng nuôi thủy sản này.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương pháp thu và phân lập vi khuẩn từ mẫu bệnh phẩm

Hai mươi mẫu cá điêu hồng bệnh được thu từ các bè nuôi cá điêu hồng thâm canh ở huyện Cai Lậy, Tiền Giang. Mẫu được thu là những con cá lờ đờ, bơi lội mất phương hướng. Mẫu cá sau khi được vớt khỏi mặt nước thì tiến hành phân tích ngay và chỉ những mẫu bệnh phẩm còn sống mới được sử dụng để phân lập vi khuẩn. Trước khi phân lập vi khuẩn, mặt ngoài cơ thể cá được khử trùng bằng cồn 70° và lau sạch. Sau đó, tiến hành mổ cá bằng dao mổ, kéo tiệt trùng. Dấu hiệu bệnh lý bên trong cơ thể cá được ghi nhận. Kế đến, dùng dao mổ tiệt trùng rạch một đường trên thân và gan. Đặt que cấy vào nơi vừa rạch, xoay nhẹ để lấy mẫu bệnh phẩm và cấy trên đĩa môi trường Brain heart infusion agar (BHIA, Merck). Não cá cũng được phân lập vi khuẩn. Đĩa cấy được ủ ở nhiệt độ khoảng 30-32°C trong 24 giờ. Các chủng vi khuẩn phân lập được trữ ở -80°C trong môi trường Brain heart infusion broth (BHIB, Merck) có 25% glycerol. Các chủng vi khuẩn nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

2.2 Phương pháp định danh vi khuẩn

Các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa được chọn để định danh vi khuẩn được trình bày ở bảng 2. Hình dạng, kích thước và tính rỗng của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram. Tính di động của vi khuẩn được quan sát bằng cách nhỏ một giọt nước cất lên lam, trải đều lên lam một ít vi khuẩn, đậy bằng lamén và quan sát bằng kính hiển vi ở vật kính 40X. Các đặc điểm sinh lý và sinh hóa được xác định dựa theo cẩm nang của Cowan và Steels (Barrow và Feltham, 1993) và sử dụng kit API 20 Strep (BioMerieux, Pháp).

Bảng 1: Các chủng vi khuẩn phân lập từ cá điều hồng chọn nghiên cứu

STT	Mã PTN	Nơi thu mẫu	Cơ quan phân lập	Năm thu mẫu
1	ĐH 1 Nào	Cai lậy, Tiền Giang	Nào	2010
2	ĐH 1 Thận	Cai lậy, Tiền Giang	Thận	2010
3	ĐH 3 Nào	Cai lậy, Tiền Giang	Nào	2010
4	ĐH 3 Thận	Cai lậy, Tiền Giang	Thận	2010
5	ĐH 3 Gan	Cai lậy, Tiền Giang	Gan	2010
6	ĐH 4 Thận	Cai lậy, Tiền Giang	Thận	2010
7	ĐH 4 Nào	Cai lậy, Tiền Giang	Nào	2010
8	ĐH 5 Thận	Cai lậy, Tiền Giang	Thận	2010
9	ĐH 5 Nào	Cai lậy, Tiền Giang	Nào	2010

2.3 Xác định kiểu huyết thanh

Kiểu huyết thanh được xác định bằng phương pháp ngưng kết miễn dịch sử dụng kit Strep-B-Latex (GBS) (Đan mạch). Hai giọt dung dịch latex (khoảng 10 µl/giọt) được nhỏ lên hai lam. Dùng que cấy tiết trùng lấy khoảng từ 3-5 khuẩn lạc cho vào 3ml nước muối sinh lý, lắc đều rồi nhỏ một giọt dung dịch vi khuẩn lên một lam. Một giọt nước muối sinh lý được nhỏ lên lam còn lại để làm đối chứng âm. Dùng tâm tiết trùng trộn đều 2 dung dịch. Phản ứng dương tính sẽ có ngưng kết xuất hiện trong 5 – 10 giây giúp xác định *Streptococcus* có kiểu huyết thanh Ib (serotype Ib) hay kiểu sinh học 2 (biotype 2).

2.4 Gây cảm nhiễm

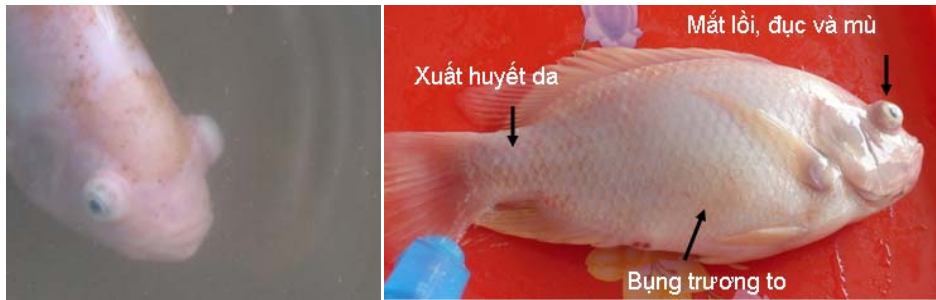
Thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm ướn Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ trên hệ thống bể nhựa (60 L). Các bể được khử trùng bằng chlorine, rửa lại bằng nước sạch. Sau đó cho nước vào bể (40 L), sục khí liên tục vài ngày để loại hết chlorine. Cá được chọn cảm nhiễm có trọng lượng khoảng 15-20 g/con, màu sắc tươi sáng, phản ứng linh hoạt. Cá được bố trí ngẫu nhiên 10 con/bể và để vài ngày cho cá quen với môi trường trong bể. Thí nghiệm được bố trí gồm 9 nghiệm thức, lặp lại ba lần: (1) đối chứng tiêm nước muối sinh lý (0.1ml/cá); (2) đối chứng không tiêm; và (3-9) tiêm vi khuẩn lần lượt với mật độ từ 10²-10⁶ CFU/ml.

Chủng vi khuẩn ĐH1Nào được chọn ngẫu nhiên trong số các chủng phân lập để gây cảm nhiễm. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường BHIB 24 giờ ở 30°C. Sau đó ly tâm vi khuẩn 7500vòng/phút trong 10 phút, rửa vi khuẩn 2 lần bằng dung dịch nước muối sinh lý 0,85% và xác định mật độ vi khuẩn bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 590nm kết hợp với phương pháp đếm số khuẩn lạc trên môi trường BHIA (CFU/ml). Cá được tiêm 0,1 ml dung dịch vi khuẩn ở phần gốc vi ngực, theo dõi liên tục biểu hiện của cá trong 14 ngày. Những con cá lờ đờ được thu để quan sát dấu hiệu bệnh lý, làm tiêu bản kính phết thận và tái phân lập và tái định danh vi khuẩn từ thận và não. Mẫu mô gan, thận và tỷ tạng của cá bệnh ở các nghiệm thức gây cảm nhiễm và cá khỏe (đối chứng) được lấy để xác định đặc điểm mô bệnh học theo phương pháp của Coolidge và Howard (1979). Nồng độ vi khuẩn gây chết 50% cá thí nghiệm (LD₅₀) được xác định theo công thức của Reed và Muench (1938): $LD_{50} = 10a-p.d$ ($p.d = (L\%-50/L\%-H\%)$); *a*: số lữ thừa mà tại đó vi khuẩn gây chết cá thấp nhất nhưng trên 50%; *H*%: tỷ lệ cá chết cao nhất nhưng dưới 50%; *L*%: tỷ lệ cá chết thấp nhất nhưng trên 50%.

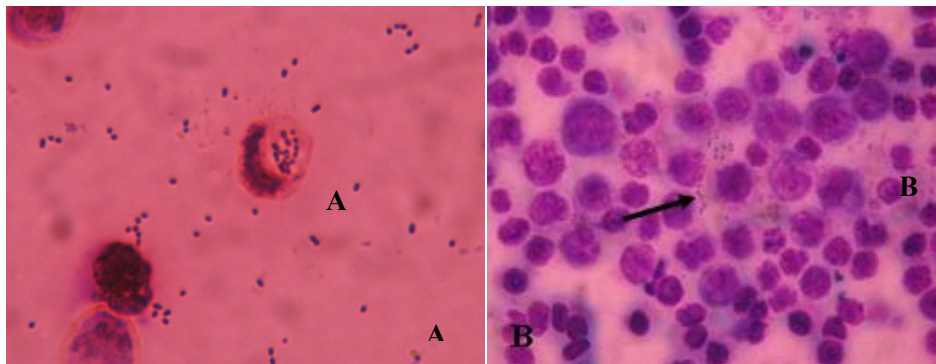
3 KẾT QUẢ

3.1 Dấu hiệu bệnh lý

Cá bệnh bơi lơ đờ, hoạt động chậm chạp, kém linh hoạt, bơi lội mất phương hướng, mắt lồi và đục, trên thân có những đốm xuất huyết ở vây ngực và vây bụng, mang tái nhạt, bụng trương to, xoang bụng có chứa dịch màu vàng, nội tạng bị xuất huyết, mền nhũn (Hình 1). Xét nghiệm kính phết mẫu máu và thận của cá bệnh bằng cách soi tươi nhuộm Gram và nhuộm Giemsa đều thấy rất nhiều vi khuẩn dạng hình cầu nằm rải rác trên vùng mô phết kính hoặc tập trung thành từng cụm. Ở một số mẫu thận cá bệnh, vi khuẩn xâm nhập, phá hủy tế bào làm tế bào bị vỡ. Các mẫu ở thận cũng cho thấy đại thực bào vi khuẩn (Hình 2A và 2B).



Hình 1: Dấu hiệu bệnh lý của cá lúc thu mẫu. A. Bơi lơ đờ trên mặt nước. B. Mắt cá bị lồi, bụng trương và xuất huyết (mũi tên)



Hình 2: Vi khuẩn trong thận của cá điều hồng bệnh thu từ bè nuôi. (A) vi khuẩn ở dịch xoang thận (nhuộm Gram, 40X); (B) Vi khuẩn tấn công vào hồng cầu (nhuộm Giemsa, 40X) (mũi tên)

3.2 Phân lập, định danh và định tủy vi khuẩn

Kết quả phân lập được 9 chủng vi khuẩn từ gan, thận và não (Bảng 1). Trên môi trường BHIA sau 48 giờ ở 30°C vi khuẩn phát triển chậm thành các khuẩn lạc có hình tròn, lồi, màu kem, kích thước từ thước khoảng 1mm (Hình 3A). Vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường có chứa 5% máu cừu nhưng không có khả năng gây tan huyết.

Bảng 2: Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá của vi khuẩn phân lập từ cá điêu hồng bệnh

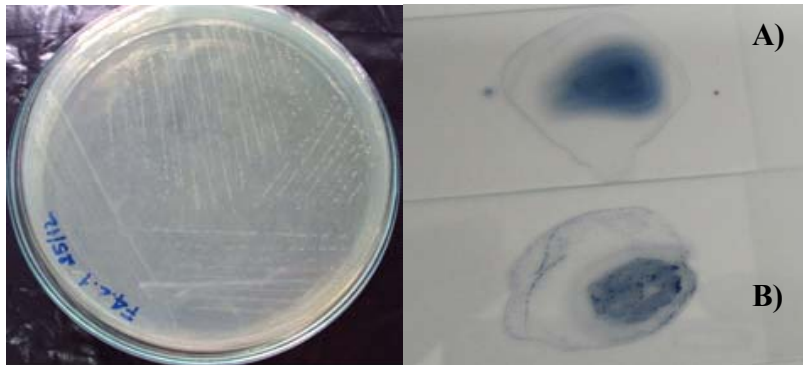
Chỉ tiêu	Chủng vi khuẩn									Buller (2004)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Nhuộm Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hình dạng	cầu	cầu	cầu	cầu	cầu	cầu	cầu	cầu	cầu	cầu
Di động	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sinh catalaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sinh oxidaza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phản ứng lên men yếm khí	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phản ứng lên men hiếu khí	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mọc trên môi trường máu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gây tan huyết	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	
Phản ứng Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hippurate hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bile-esculin tolerance	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyrrolidonyl arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sinh α-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sinh β-glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
Sinh β-galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alkaline phosphatase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leucine AminoPeptidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine Dihydrolase	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-/+
Sử dụng đường										
Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+s
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Kiểu huyết thanh	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	

Ghi chú: (1) ĐH1 Não; (2) ĐH1 Thận; (3) ĐH3 Não; (4) ĐH3 Thận; (5) ĐH3 Gan; (6) ĐH4 Thận; (7) ĐH4 Não; (8) ĐH5 Thận; (9) ĐH5 Não; (+) dương tính; (-) âm tính; (+s) phản ứng chậm

Kết quả quan sát và phân tích các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập từ cá điêu hồng bệnh xuất huyết được trình bày ở Bảng 2. Chúng là vi khuẩn Gram dương, hình cầu hay liên cầu, không di động, phản ứng âm tính với oxidase và catalase, không có khả năng lên men glucose trong cả hai điều kiện hiếu khí và kỵ khí. Kết quả kiểm tra các chỉ tiêu sinh hóa bằng kit API 20 Strep (Bảng 2) cho thấy tất cả 9 các chủng vi khuẩn cho phản ứng âm tính với Esculin và Pyrrolidonyl Arylamidase, dương tính với Voges Proskauer, có khả năng thủy phân hippuric acid, không có khả năng acid hóa hầu hết tất cả các loại

đường. Tuy nhiên, có 3/9 chủng vi khuẩn cho phản ứng Arginine Dihydrolase dương tính. Dựa trên các chỉ tiêu sinh hóa và căn cứ vào mã số định danh của kit API 20 Strep, tất cả 9 chủng vi khuẩn được định danh là *Streptococcus agalactiae*. Kết quả này tương tự như kết quả của Buller (2004) khi định danh vi khuẩn *S. agalactiae* dựa trên các phản ứng sinh hóa của bằng kit API 20 Strep, ngoại trừ chỉ tiêu glycogen là âm tính trong so với kết quả của Buller (2004) là dương tính. Ngoài ra, Salvador *et al.* (2005) cũng định danh *S. agalactiae* với các chỉ tiêu tương tự.

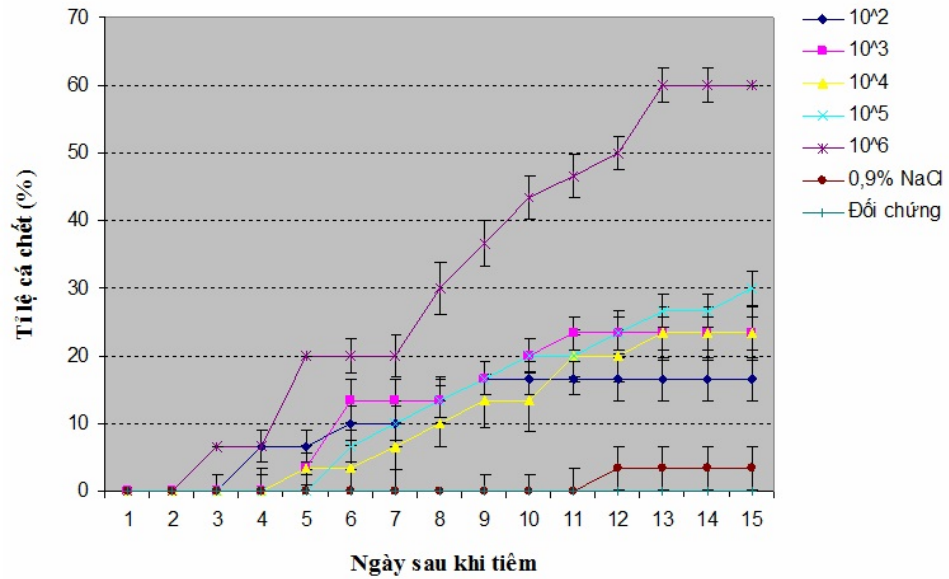
Phản ứng ngưng kết miễn dịch dựa trên nguyên tắc của sự liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể có thể nhìn thấy được ở dạng kết khối (Gella *et al.*, 1991). Trong nghiên cứu này, phản ứng ngưng kết miễn dịch giúp phát hiện nhanh và nhận dạng kiểu huyết thanh (serotíp) Ib hay kiểu sinh học (biotype) 2 của vi khuẩn *S. agalactiae*. Kết quả cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn cho kết quả dương tính giúp xác định các chủng vi khuẩn phân lập được là *S. agalactiae* týp 2 (Bảng 2, Hình 3B).



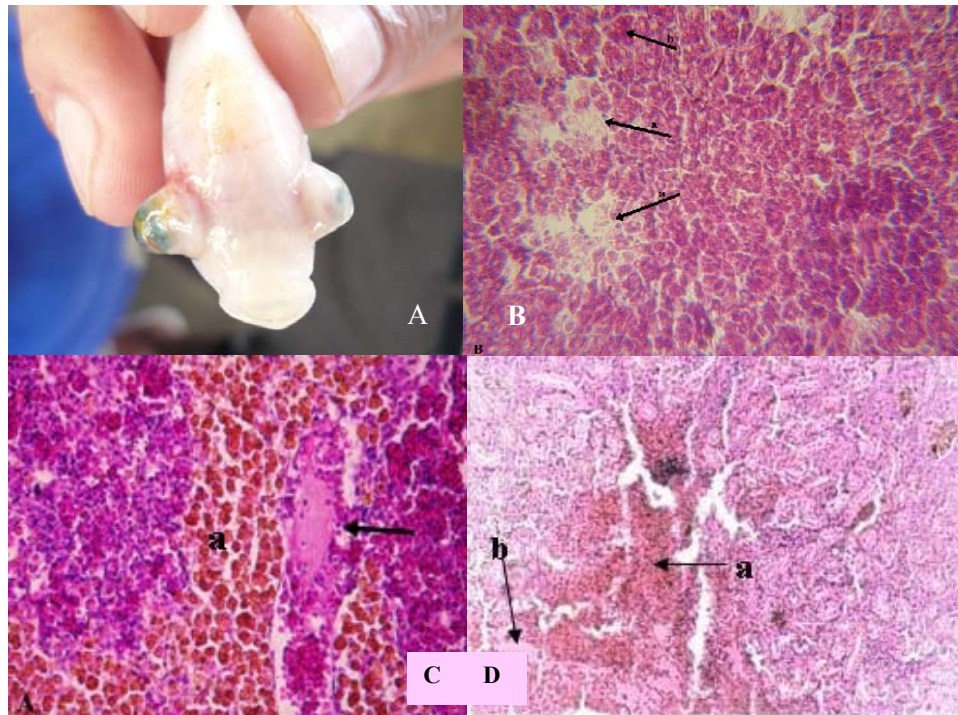
Hình 3: (trái) Khuẩn lạc trên môi trường BHIA. (phải) Kết quả ngưng kết miễn dịch. A. âm tính; B. dương tính

3.3 Khả năng gây bệnh xuất huyết ở cá điêu hồng của vi khuẩn phân lập

Kết quả thí nghiệm gây cảm nhiễm chủng ĐH1 não ở những nồng độ khác nhau thì tỉ lệ chết và thời gian xuất hiện bệnh cũng khác nhau. Ở tất cả các mật độ vi khuẩn thí nghiệm đều có cá chết ngoại trừ đối chứng không tiêm (Hình 4). Cá thí nghiệm bắt đầu chết vào ngày đầu tiên gây cảm nhiễm ở mật độ 10^5 CFU/ml sau 8 giờ gây cảm nhiễm. Tuy nhiên, kết quả phân lập vi khuẩn cho thấy cá không bị nhiễm vi khuẩn. Như vậy, cá chết có thể do bị sốc vì thao tác tiêm vi khuẩn. Vào ngày thứ 3 tất cả các nghiệm thức đều có cá chết, ngoại trừ nghiệm thức đối chứng không tiêm và nghiệm thức tiêm nước muối sinh lý.



Hình 4: Biểu đồ tỷ lệ cá chết (%) theo ngày cảm nhiễm



Hình 5: A: Dấu hiệu bệnh lý của cá thí nghiệm cảm nhiễm. B: Vùng tế bào gan bị hoại tử (mũi tên). C: (a) trung tâm đại thực bào sắc tố ở tỳ tạng và vùng tế bào mất cấu trúc và có dịch viêm (mũi tên). D: thận cá nhiễm khuẩn (H&E, 100X) với nhiều vùng hoại tử nặng (a và b)

Sau 14 ngày theo dõi thí nghiệm, ở mật độ tiêm vi khuẩn 10^6 CFU/ml cá chết 100%, tỉ lệ chết thấp nhất (20%) ở mật độ tiêm vi khuẩn 10^1 CFU/ml. Ở các mật độ còn lại 10^0 đến 10^5 CFU/ml cá chết với tỉ lệ lần lượt là 23,3%; 23,3%; 36,7%; 46,7% và 50%. Riêng bể tiêm nước muối sinh lý cũng có cá chết, tuy nhiên chỉ có 1 con cá chết (10%) vào ngày thứ 12 sau khi tiêm chứng tỏ nguyên nhân cá chết không phải do thao tác tiêm hay do cảm nhiễm vi khuẩn mà có thể do môi trường nước và tỉ lệ chết này là không đáng kể so với các nghiệm thức còn lại. Từ kết quả thí nghiệm gây cảm nhiễm xác định được giá trị LD_{50} của chủng vi khuẩn ĐH1nã là $4,89 \times 10^4$ CFU/ml.

Cá chết ở thí nghiệm cảm nhiễm có dấu hiệu bệnh lý giống nhau là tách đàn, bỏ ăn và bơi lội lờ đờ trên mặt nước. Mắt lồi và đục, xuất huyết ở các vây và xương nắp mang (Hình 5A). Quan sát mô gan của cá gây cảm nhiễm có một số biến đổi. Cấu trúc tế bào gan bị phá hủy, nhiều vùng tế bào có hiện tượng xuất huyết, bị biến đổi cấu trúc và hoại tử (Hình 5B). Tỳ tạng xuất hiện những dịch viêm và mất cấu trúc (Hình 5C). Mô thận cá điều hồng có nhiều vùng bị biến đổi cấu trúc, ống thận bị hoại tử (Hình 5D).

Những con cá gần chết sau khi gây cảm nhiễm được giải phẫu và tái phân lập vi khuẩn ở thận trước của cá trên môi trường BHIA sau 24 giờ ở nhiệt độ 30°C . Khuẩn lạc ở các đĩa BHIA có màu sắc và hình dạng khuẩn lạc tương tự nhau là màu kem, hình tròn, lồi, kích thước 1 mm, giống với khuẩn lạc của vi khuẩn phân lập từ mẫu cá điều hồng bệnh lúc thu mẫu. Vi khuẩn tái phân lập được từ những cá bệnh trong khoảng 24 -48 giờ sau khi cảm nhiễm được xác định là có các chỉ tiêu hình thái sinh lý, sinh hóa và kiểu huyết thanh giống như chủng vi khuẩn cảm nhiễm *S. agalactiae* ĐH1nã.

4 THẢO LUẬN

Chín chủng vi khuẩn phân lập từ cá điều hồng bệnh có những đặc tính chung của nhóm vi khuẩn *Streptococcus* là Gram dương, có hình cầu, không có khả năng di động trong môi trường lỏng, cho phản ứng oxidase và catalase âm tính, không có khả năng lên men glucose trong cả hai điều kiện hiếu khí và kỵ khí, mọc trên môi trường thạch máu nhưng không có gây tan huyết (Barrow và Feltham, 1993, Buller, 2004). Mặt khác, chúng cho phản ứng voges-proskauer, hippurate, alkaline phosphatase và leucine aminopeptidase dương tính nhưng âm tính với các loại đường, Pyrrolidonyl arylamidase, α -galactosidase và nhất là âm tính với Bile-sculin. Các đặc tính sinh hóa này giúp phân biệt vi khuẩn *S. agalactiae* với các nhóm cầu khuẩn khác và nhất là trong nhóm *Streptococcus* (Buller, 2004; Salvador *et al.*, 2005). Thêm vào đó, tất cả các chủng đều cho phản ứng ngưng kết dương tính với kiểu huyết thanh Ib (kiểu sinh học 2) góp phần khẳng định các chủng vi khuẩn phân lập được là *S. agalactiae* týp 2.

Sự hiện diện cầu khuẩn gram dương nằm rải rác hoặc tập trung thành từng đám trên vùng mô kính phết thận khi nhuộm Gram cũng được mô tả ở cá chim bạc *Pampus argenteus* và điều hồng nhiễm *S. agalactiae* (Duremdez *et al.*, 2004). Hiện tượng xuất huyết, bị biến đổi cấu trúc, hoại tử và xuất dịch viêm ở gan, thận và tỳ tạng cho thấy khả năng gây bệnh ở mức tế bào của vi khuẩn *S. agalactiae*. Theo Robert (1989) thì biểu hiện của sự xuất huyết là khi cơ quan bị viêm, lúc này có

thể sẽ huy động một lượng lớn các tế bào hồng cầu vùng bị viêm, khi quá trình này diễn ra quá mức dẫn đến các mao mạch bị vỡ, các tế bào máu thoát ra ngoài xen lẫn với các tế bào của cơ quan, quá trình này kéo dài dẫn đến hoại tử mất cấu trúc.

Khả năng gây bệnh xuất huyết trên cá điêu hồng của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* trong nghiên cứu này tương tự như kết quả cảm nhiễm *S. agalactiae* trên cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) của Suanyuk *et al.* (2005). Nhóm tác giả này đã tiến hành gây cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* với các nồng độ từ $10^1 - 10^8$ CFU/ml bằng phương pháp tiêm và sau 10 ngày và đã ghi nhận được giá trị LD₅₀ dao động từ $3,6 \times 10^1 - 1,72 \times 10^7$ CFU/ml. Amal *et al.* (2008) đã gây cảm nhiễm trên cá điêu hồng có trọng lượng trung bình từ 85-100g với ở các nồng độ từ $10^4 - 10^8$ CFU/ml và xác định được vi khuẩn gây chết ở nồng độ 3×10^6 CFU/ml, cá bắt đầu chết sau 24 giờ tiêm vi khuẩn. Cùng thí nghiệm này Rattanachaikunsopon và Phumkhachorn (2009) sử dụng vi khuẩn *S. agalactiae* tiêm cho cá rô phi và tìm được giá trị LD₅₀ khoảng $3,97 \times 10^5$ CFU/ml.

Ngoài thời điểm biểu hiện bệnh lý thì tỷ lệ chết cũng phản ánh khả năng gây bệnh của vi khuẩn. Sau 14 ngày theo dõi, ở nghiệm thức tiêm 10^6 CFU/ml có cá chết với tỉ lệ cao nhất (100%) và thấp nhất là 20% ở nghiệm thức tiêm 10^1 CFU/ml. Kết quả này tương tự như kết quả thí nghiệm của Suanyuk *et al.* (2005) cá chết với tỷ lệ cao nhất là 90% khi tiêm vi khuẩn với mật độ 10^8 CFU/ml và thấp nhất là 20% khi tiêm vi khuẩn ở mật độ 10^1 CFU/ml.

5 KẾT LUẬN

Các chủng vi khuẩn phân lập từ các mẫu cá điêu hồng có dấu hiệu xuất huyết và phù mắt là *S. agalactiae* týp 2. Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm xác định các chủng vi khuẩn này có khả năng gây bệnh trên cá khõe trong điều kiện cảm nhiễm thực nghiệm giống như dấu hiệu bệnh ở cá thu từ bè nuôi. Giá trị LD₅₀ của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* ĐH1nã là $4,89 \times 10^4$ CFU/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amal, A. M. N., Nazifah, N, Zahrah, A.S. , Sabri, M.V. , Saad, M.Z. 2008. Determination of LD50 for Streptococcus agalactiae infections in red tilapia and gift. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 1245-1251.
- Barrow, G. I. and Feltham, R. K. A. 1993. Cowan and Steel's manual for the indentification of medical bacteria, 3rd edn. Cambridge Univesity Press, Cambridge. 262
- Buller, N.B., 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practice identification manual, 361 pp.
- Coolidge and Howard, R.M.. 1979. Animal Histology Procedures (2nd edn. ed.), National Institutes of Health, Bethesda.
- Evans, J., Klesius, P.H. and Shoemaker, C.A. 2006. Streptococcus in warm-water fish. Aquaculture Health International. 10-14
- Gella, F. J., Serra, J. and Gener, J. 1991. Latex agglutination procedures in Immunodiagnosis. Pure&App/. Chem. 63 (8): 1131-1134.
- Salvador, R., Muller, E. E., de Freitas, J. C., Leonhardt, J. H., Pretto-Giordano, L. G., Dias, J. A. 2005. Isolation and characterization of Streptococcus spp. group B in Nile tilapias

- (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 35 (6):1374-1378.
- Suanyuk, N., Kanghear, H., Khongpradit, R. and Supamattaya, K. 2005. *Streptococcus agalactiae* infectin in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Songklanakarin J. Sci. Tech.* (27):307-319.
- Rattanachaikunsopon P. and Phumkhachorn. P, 2008. Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* effection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon ratchathani University, Warin Chamrap, Upon Ratchathani 34190, Thailand.