



## **STREPTOCOCCUS INIAE, TÁC NHÂN GÂY BỆNH “ĐEN THÂN” TRÊN CÁ RÔ ĐỒNG (ANABAS TESTUDINEUS)**

Từ Thanh Dung<sup>1</sup>, Huỳnh Thị Ngọc Thanh và Nguyễn Khương Duy

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

### **ABSTRACT**

*This study describes the first isolation Streptococcus iniae as causative agent of “dark body” disease in climbing perch (Anabas testudineus). A total of 114 diseased climbing perch samples with darkened body colour and lethargy was collected from different commercial farms in the Mekong Delta. Diseased fish showed external signs of dark coloration and eyes with corneal opacity. Internally, ascites, hepatomegaly, and splenomegaly were observed. All potential agents were considered. Small, opaque and pure colonies isolated from fish liver, kidney, spleen, blood, eyes and brain on brain heart infusion agar (BHI) and blood agar (BA) were observed in pure culture after 24-36 hours incubating at 28°C. Colonies were chain-forming and Gram positive cocci. Conventional and rapid identification systems and 16S rRNA gene partial sequencing were used to identify the strain isolated from “dark body” disease as Streptococcus iniae. LD<sub>50</sub> trials was carried out with two S. iniae isolates, at concentrations from 10<sup>3</sup> to 10<sup>6</sup> CFU/mL, in healthy climbing perch (3-6g body weight), with values of 3,73×10<sup>3</sup> CFU/mL after 120h and 2,43×10<sup>5</sup> CFU/mL after 144h. An experimental injection challenge study fulfilled Koch’s postulates. Experimented showed similar clinical signs to the natural infection.*

### **TÓM TẮT**

*Nghiên cứu mô tả lần đầu tiên phân lập vi khuẩn Streptococcus iniae là tác nhân gây bệnh “đen thân” trên cá rô đồng (Anabas testudineus). Nghiên cứu đã thu được 114 mẫu cá rô đồng bệnh có dấu hiệu đen thân ở các ao nuôi thâm canh khác nhau ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Cá bệnh có dấu hiệu khắp vùng lưng màu đen, mắt cá mờ đục, xuất huyết nội quan, gan, thận và tụy tạng sưng to. Các mẫu cá được kiểm tổng quát các tác nhân gây bệnh. Sau thời gian ủ 24-36 giờ ở 28°C, các khuẩn lạc thuần dạng nhỏ li ti, trắng đục được phân lập từ các mẫu gan, thận, tụy tạng, máu, mắt và não cá bệnh xuất hiện nhiều trên môi trường brain heart infusion agar (BHI) và thạch máu (BA). Quan sát tế bào vi khuẩn nhuộm Gram có hình cầu, dạng chuỗi, Gram dương. Kết quả kiểm tra đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa, kit API 20Strep và giải trình tự gen 16S rRNA đã xác định vi khuẩn phân lập trên cá rô đồng bệnh “đen thân” là Streptococcus iniae. Hai chủng vi khuẩn S. iniae điển hình được sử dụng để gây thí nghiệm cảm nhiễm trên cá rô đồng giống khôe (trọng lượng 3-6 g) bằng phương pháp tiêm 4 nồng độ từ 10<sup>3</sup> đến 10<sup>6</sup> CFU/mL. Giá trị LD<sub>50</sub> đạt được là 3,73×10<sup>3</sup> CFU/mL sau 120 h và 2,43×10<sup>5</sup> CFU/ml sau 144h. Kết quả cảm nhiễm đã thỏa mãn định đề Kochs. Cá rô đồng nhiễm bệnh sau khi gây cảm nhiễm có dấu hiệu lâm sàng giống với bệnh “đen thân” ngoài ao nuôi.*

### **Thông tin chung:**

Ngày nhận: 19/12/2012

Ngày chấp nhận: 20/06/2013

### **Title:**

*Streptococcus iniae, the causative agent of “dark body” disease in climbing perch (Anabas testudineus) in the Mekong Delta*

### **Từ khóa:**

*Cá rô đồng (Anabas testudineus), bệnh “đen thân”, LD<sub>50</sub>, Streptococcus iniae*

### **Keywords:**

*Climbing perch (Anabas testudineus), “dark body” disease, Streptococcus iniae, LD<sub>50</sub>*

## 1 GIỚI THIỆU

Cá rô đồng (*Anabas testudineus*) là loài cá phân bố rộng, có thể sống ở các thủy vực nước ngọt và nước lợ. Chúng phân bố nhiều quốc gia trên thế giới như Úc, Ấn Độ, Trung Quốc, Philippin, Thái Lan, Lào, Campuchia, Việt Nam và nhiều quốc gia châu Á khác (Fishbase, 2010). Ở nước ta, việc ứng dụng các tiến bộ khoa học kỹ thuật, thâm canh và đa dạng hóa các đối tượng nuôi chủ lực như cá tra, basa, rô phi, điêu hồng,... đã góp phần nâng cao hiệu quả trong nuôi trồng thủy sản. Gần đây, cá rô đồng đang là đối tượng nuôi chủ yếu ở các tỉnh như Hậu Giang, Cần Thơ, Đồng Tháp, Tiền Giang... Tuy nhiên, việc mở rộng diện tích nuôi cũng như việc thâm canh hóa đối tượng nuôi này đã phát sinh nhiều vấn đề cần được quan tâm, đặc biệt là dịch bệnh do vi khuẩn. Trong đó, bệnh do nhóm vi khuẩn *Streptococcus* hiện đang gây nguy hiểm trên nhiều loài cá nuôi và thiệt hại cho nghề nuôi trồng thủy sản trên thế giới hàng năm lên đến 150 triệu đô la (Romalde *et al.*, 2009). Trong nhóm vi khuẩn này, *Streptococcus iniae* gây bệnh trên nhiều loài cá nước ngọt và lợ. Theo một số nghiên cứu gần đây đã tìm thấy ít nhất 27 loài cá nuôi và tự nhiên đã nhiễm bệnh do vi khuẩn *S. iniae* (Agnew và Barnes, 2007). Tuy nhiên cho đến nay chưa có tài liệu nào công bố về bệnh do *S. iniae* trên cá rô đồng. Bệnh “đen thân” trên cá rô đồng hiện nay gây thiệt hại lớn cho người nuôi, với tỉ lệ hao hụt trên 50%. Chính vì thế, việc xác định tác nhân *S. iniae* gây bệnh “đen thân” trên cá rô là vấn đề cấp thiết và được thực hiện trong nghiên cứu này.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Kiểm tra bệnh cá

Mẫu cá rô đồng bệnh “đen thân” được thu từ 20 ao nuôi thâm canh ở một số tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Tổng số mẫu bao gồm 114 mẫu cá rô đồng có biểu hiện bệnh “đen thân” và 26 cá khỏe trọng lượng 6-200 g, được thu từ các ao nuôi thâm canh ở tỉnh Hậu Giang, Đồng Tháp, Cần Thơ và Tiền Giang, cá được thu suốt từ tháng 2/2011-4/2012. Các thông số về kỹ thuật nuôi, điều kiện chăm sóc,

quản lý ao nuôi cũng như dấu hiệu lâm sàng được ghi nhận. Mẫu được giữ lạnh và đưa về phân tích phòng thí nghiệm Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

Mẫu cá được kiểm tra sức khỏe tổng quát bao gồm ký sinh trùng, nấm và vi khuẩn. Ký sinh trùng được kiểm tra dựa theo mô tả Noga (2010), lấy mẫu nhót trên da và mang cá và quan sát mẫu dưới kính hiển vi với độ phóng đại 4-40X. Kiểm tra nấm trên cá dựa theo mô tả của Hatai and Egusa (1979), quan sát sợi nấm trên tiêu bản tươi, mẫu bệnh sau đó được rửa với nước muối sinh lý và được cấy trên môi trường GYA (Glucose 1%, Yeast extract 0,25% và Agar 1,5%) đã thêm Streptomycin và Ampicillin 500 µg/ml, các đĩa được ủ 2-4 ngày ở 28-30°C. Kiểm tra vi sinh được tiến hành dựa theo cẩm nang của Frerichs và Millar (1993), mẫu gan, thận, tỳ tạng, máu, mắt và não cá bệnh “đen thân” được cấy trên môi trường brain heart infusion agar (BHIA, Merck) và thạch máu (BA: Blood agar, Nam Khoa), được ủ sau 24 - 36h, ở 28°C.

### 2.2 Phân lập và định danh vi khuẩn

Vi khuẩn phát triển trên môi trường BHI agar và BA được kiểm tra các chỉ tiêu cơ bản như: nhuộm Gram, tính di động, oxidase, catalase, phản ứng O/F, khả năng dung huyết. Định danh vi khuẩn được dựa các chỉ tiêu hình thái, sinh lý, sinh hóa theo cẩm nang của Cowan và Steel (1993), Frerichs và Millar (1993) và Buller (2004) đồng thời sử dụng bộ kit API 20Strep (BioMerieux, Pháp) với các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất và giải trình tự gen 16S rRNA tra cứu trên ngân hàng Gen bằng chương trình Blast Search tại phòng thí nghiệm Nam Khoa Biotek.

### 2.3 Thí nghiệm cảm nhiễm xác định LD<sub>50</sub> (Lethal Dose) vi khuẩn gây bệnh

**Cá thí nghiệm:** Cá rô đồng giống khỏe có trọng lượng 6 - 10 gram/con, được sử dụng thí nghiệm gây cảm nhiễm trên hệ thống bể nhựa (60L). Các bể sau khi được tiệt trùng và rửa sạch, cho nước vào bể (40L), sục khí liên tục vài ngày để loại hết chlorine. Trước khi gây

cảm nhiễm, cá được kiểm tra sức khỏe để đảm bảo hoàn toàn không nhiễm bệnh. Cá được thuần dưỡng trong điều kiện thí nghiệm 2 tuần với mật độ 10 con/bể. Suốt thời gian thí nghiệm được bổ sung sục khí và cho ăn thức ăn của công ty Cargill Việt Nam. Thí nghiệm được tiến hành ở phòng thí nghiệm ướn tại Khoa Thủy sản-Trường Đại học Cần Thơ.

**Vi khuẩn gây cảm nhiễm:** Hai chủng *S. iniae* S2FC4 và S8FC1 phân lập từ cá rô bệnh “đen thân” tại ao nuôi sử dụng cho thí nghiệm

cảm nhiễm. Sau khi vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong Brain-Heart infusion broth (BHIB) trên máy lắc ở 28°C 18-24h, tiến hành ly tâm 13000 vòng ở 4°C trong 10 phút, sau đó rửa lại với dung dịch với nước muối sinh lý (0,85% NaCl), lặp lại trong 2 lần. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng đo ở bước sóng 620 nm ( $OD=1 \pm 0,02$ ) tương đương mật độ vi khuẩn là  $10^8$  CFU/mL. Sau đó pha loãng trên thạch máu và đếm khuẩn lạc sau 36 h ở 28°C. Các mật độ vi khuẩn gây cảm nhiễm trong nghiên cứu này được trình bày ở Bảng 1:

**Bảng 1: Mật độ vi khuẩn sử dụng thí nghiệm cảm nhiễm**

Chủng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)
<i>S. iniae</i> S2FC4	$2,03 \times 10^3$ , $2,03 \times 10^4$ , $2,03 \times 10^5$ , $2,03 \times 10^6$
<i>S. iniae</i> S8FC1	$1,4 \times 10^3$ , $1,4 \times 10^4$ , $1,4 \times 10^5$ , $1,4 \times 10^6$

**Phương pháp cảm nhiễm:** Cá thí nghiệm được tiêm vào xoang bụng liều 0.1 mL/cá với mật độ vi khuẩn ở Bảng 1. Riêng nghiệm thức đối chứng được tiêm nước muối sinh lý tiệt trùng (0,85% NaCl) cũng với liều này. Tất cả các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Số lượng, thời điểm cá chết và các dấu hiệu lâm sàng được ghi nhận trong quá trình thí nghiệm. Nước được thay mỗi ngày và nhiệt độ nước được biến động trong khoảng 28 - 31°C. Cá lờ đờ hay vừa mới chết được phân lập vi khuẩn ở gan, thận trước, tỳ tạng, máu, mắt và não trên môi trường BHI agar và BA. Cá sau khi gây cảm nhiễm theo dõi trong suốt 14 ngày. Khi kết thúc thí nghiệm, giá trị  $LD_{50}$  được xác định theo phương pháp của Reed và

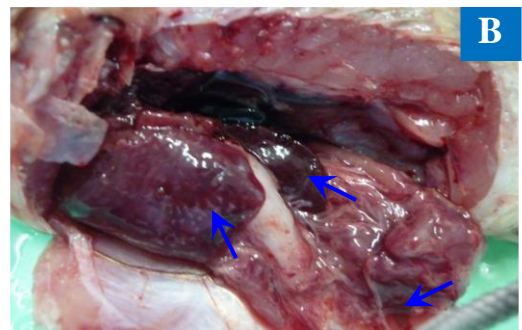
Muench (1938). Số liệu cảm nhiễm được phân tích bằng chương trình Microsoft Excel.

### 3 KẾT QUẢ

#### 3.1 Dấu hiệu bệnh lý

**Biểu hiện bên ngoài:** Cá bệnh có biểu hiện giảm ăn, bơi lờ đờ trên mặt ao, cơ thể cá có màu đen bất thường (Hình 1A). Cá bệnh nặng thường có biểu hiện co giật, bơi lội bất thường trên mặt nước. Mắt cá lồi và đục, bụng trương to (Hình 1A), nhiều trường hợp cá bệnh xuất huyết ở hậu môn, xung quanh mắt và các gốc vây.

**Biểu hiện bên trong:** Xoang bụng có dịch máu; gan, thận và tỳ tạng sưng to và xuất huyết (Hình 1B).



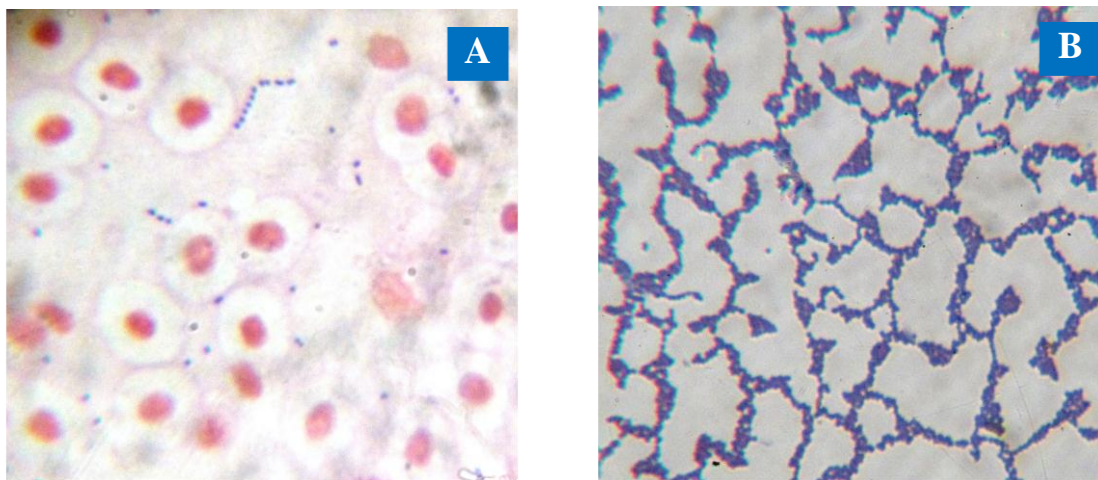
**Hình 1: A: Cá rô bệnh biểu hiện thân đen sẫm, mắt đục và bụng to (mũi tên). B: Xoang chứa dịch máu, gan và tỳ tạng sưng to (mũi tên)**

### 3.2 Phân lập và định danh tác nhân gây bệnh

Kết quả kiểm tra ngoại và nội ký sinh trùng không thấy sự khác biệt giữa cá bệnh “đen thân” và cá khỏe. Điển hình như các mẫu cá rô kiểm tra thường xuất hiện trùng bánh xe, *Henneguya* và sán lá 16 móc *Dactylogyrus sp* ở mức độ cảm nhiễm thấp (1 - 4 con/lame). Cá rô đồng nuôi nhiễm nội ký sinh *Camallanus sp.* với mật độ thấp (1 - 2 trùng/cá). Như vậy, ký sinh trùng trên mang và da cá rô đồng không là tác nhân gây nên bệnh “đen thân”. Tương tự, kết quả quan sát mẫu tươi không tìm thấy sợi nấm hay khuẩn ty trên mẫu da và một số cơ quan nội tạng.

Tổng cộng 97 chủng vi khuẩn được phân lập từ gan, thận, tỳ tạng, máu mắt và não của

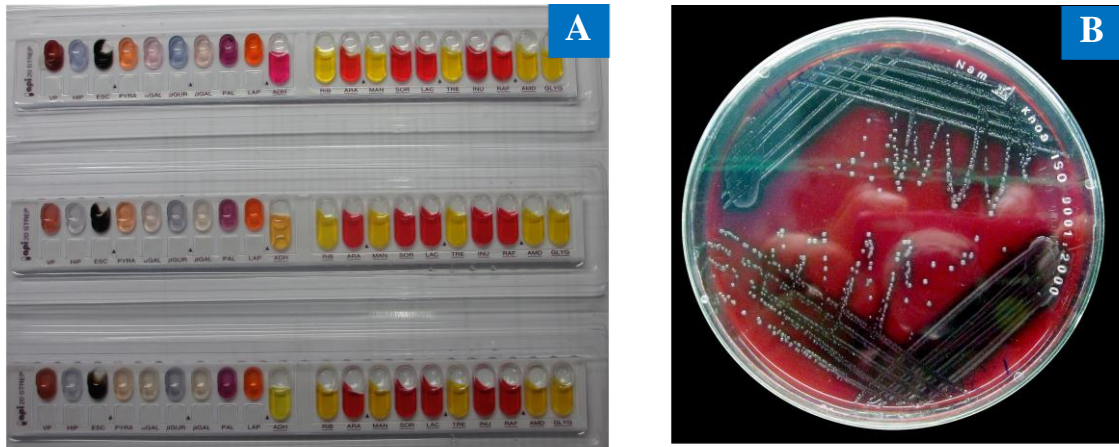
cá bệnh “đen thân” trên môi trường BHI và BA. Hầu hết đều xuất hiện vi khuẩn thuần sau 24 - 36 h ủ ở nhiệt độ 28°C. Vi khuẩn phân lập được đều là các tế bào vi khuẩn Gram dương (Hình 2B), dạng chùm trên môi trường thạch và dạng chuỗi hoặc đơn cầu trên môi trường lỏng hay các mẫu máu (Hình 2A). Kết quả nghiên cứu này tìm thấy vi khuẩn trong các mẫu phân lập thuộc nhóm *Streptococcus*. Vi khuẩn phát triển trên môi trường BHI agar và BA sau 24 - 36 h ở 28°C, đường kính khuẩn lạc khoảng 1 mm, màu trắng đục, bề mặt trơn láng. Vi khuẩn có khả năng dung huyết dạng  $\beta$  trên môi trường thạch máu (Hình 3B) và phát triển trong môi trường NaCl 6.5%, âm tính với Catalase, Oxidase, O/F, không phát triển ở pH 9.6 hay ở nhiệt độ 60°C (Bảng 2).



Hình 2: A: Mẫu máu cá nhiễm *S. iniae* phết trên lame, các tế bào vi khuẩn hình cầu và chuỗi tập trung quanh tế bào máu (40X), B: Vi khuẩn *S. iniae* Gram dương hình cầu

Bảng 2: Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa vi khuẩn gây bệnh “đen thân” trên cá rô

Chỉ Tiêu	<i>S. iniae</i> (Buller, 2004)	<i>S. iniae</i> phân lập (n= 97)
Gram	+	+
Hình dạng	Cầu, chuỗi	Cầu, chuỗi
Kích thước khuẩn lạc	1 mm	1 mm
Số ngày phát triển	24-48 giờ	24 giờ
Dung huyết	$\beta$	$\beta$
Catalase	-	-
Oxidase	-	-
ADH	+	+/-
O/F	-	-
NaCl 6,5%	-	+
pH 9,6	-	-
60°C	-	-



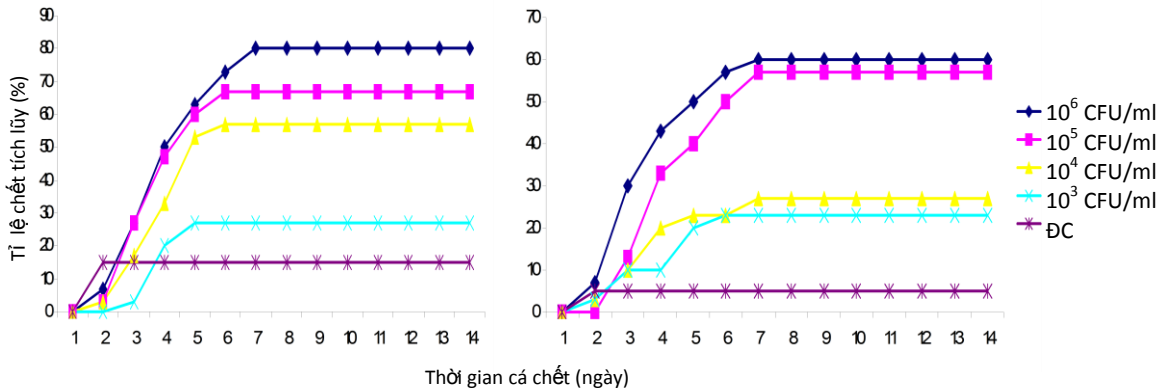
**Hình 3: A: Kết quả định danh bằng kit API 20 Strep, B: Khuẩn lạc *S. iniae* trên môi trường BA, (dung huyết dạng  $\beta$ )**

Kết quả định danh bằng kit API20 Strep (BIOMÉRIEUS, Pháp) cho thấy, tất cả vi khuẩn cho phản ứng Voges-Proskauer (VP), hippurate (HIP), and  $\alpha$ -galactosidase ( $\alpha$ -GAL) âm tính. Trong khi đó, cho phản ứng dương tính với esculine degradation (ESC), pyridonylamidase (PYRA),  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -GUR), alkaline phosphatase (PAL), leucine arylamidase (LAP). Đặc biệt, đối với ribose (RIB), mannitol (MAN), trehalose (TRE), amygdalin (AMD) và glycogen (GLY) bị a-xít hóa (dương tính) bởi các chủng vi khuẩn này. Trong khi hầu hết các chủng phân lập không thể oxy hóa các loại đường còn lại như: arabinose (ARA), sorbitol (SOR), lactose (LAC), inuline (INU) và raffinose (RAF). Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của các chủng trong nghiên cứu này giống với chủng vi khuẩn *Streptococcus iniae* trong nghiên cứu của Buller (2004) trừ chỉ tiêu arginine hydrolysis (AHD) có thể thay đổi (+/-) tùy theo các chủng phân lập (Hình 3A). Đồng thời kết hợp ứng dụng sinh học phân tử giải trình tự gen 16S rRNA được tra cứu trên ngân hàng Gen bằng chương trình Blast Search đã khẳng định được vi khuẩn hình cầu là *Streptococcus iniae* có trình tự gen tương đồng là 100%.

### 3.3 Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm LD<sub>50</sub>

Kết quả cảm nhiễm nhân tạo 2 chủng vi

khuẩn *Streptococcus iniae* S2FC4 và S8FC1 trên cá rô đã xuất hiện các dấu hiệu lâm sàng giống với cá rô bệnh “đen thân” ngoài ao nuôi. Sau 18 giờ cảm nhiễm, cá thí nghiệm có dấu hiệu bệnh đen thân, bơi lờ đờ và cá chết đã được ghi nhận sau 27 giờ gây cảm nhiễm ở các mật độ  $10^6$  CFU/mL. Sau 36 giờ, cá bắt đầu xuất hiện bụng trương to, xuất huyết các góc ngực, vây đuôi và vây hậu môn. Sau đó, cá có biểu hiện mắt mờ đục và lồi, gan, thận, tỷ tạng sưng và xuất huyết đã được ghi nhận ở tất cả các lô cảm nhiễm. Sau 7 ngày gây cảm nhiễm, cá ở các nghiệm thức đều chết với tỉ lệ từ 20-80%. Sau 14 ngày cảm nhiễm, tỉ lệ cá chết trên các chủng vi khuẩn cảm nhiễm *S. iniae* S2FC4 và S8FC1 ở mật độ  $10^6$  CFU/ml lần lượt là 60% và 80%. Trong khi đó, lô đối chứng (không tiêm vi khuẩn *S.iniae*), cá vẫn hoạt động bình thường trong suốt thời gian thí nghiệm. Vi khuẩn phân lập được từ cá thí nghiệm cảm nhiễm này được tái định danh cho kết quả giống với kết quả vi khuẩn gây bệnh “đen thân” ngoài tự nhiên. Như vậy, loài vi khuẩn Gram dương, hình cầu *S. iniae* là tác nhân gây bệnh “đen thân” trên cá rô đồng. Qua thí nghiệm này, giá trị LD<sub>50</sub> trên 2 chủng vi khuẩn cảm nhiễm *S. iniae* S2FC4 và S8FC1 được xác định lần lượt là  $3,73 \times 10^3$  CFU/mL sau 120h và  $2,43 \times 10^5$  CFU/mL sau 144h.



Hình 4: Đồ thị tỉ lệ chết gây cảm với 2 chủng *S.iniae* S2FC4 và S8FC1 (từ trái qua)

#### 4 THẢO LUẬN

Trong nuôi trồng thủy sản, nhóm vi khuẩn *Streptococcus* là tác nhân gây bệnh của hầu hết các loài cá nuôi và tự nhiên ở vùng nước ngọt, lợ và mặn (Agnew và Barnes, 2007 và Pasnik *et al.*, 2009). Ở Nhật, vi khuẩn này gây bệnh trên cá hồi *Oncorhynchus mykiss* được báo cáo đầu tiên năm 1958 do Hoshina *at al.* Năm 1976, Pier và Madin lần đầu phân lập *S. iniae* từ các vết thương trên cá heo *Inia geoffrensis*. Sau đó, vi khuẩn nguy hiểm này gây bệnh trên nhiều loài cá làm tổn thất lớn về kinh tế (Creepers và Buller, 2006 và Noga, 2010). Trên cá rô đồng, trong nghiên cứu này lần đầu tiên phân lập được *S. iniae* trên cá rô đồng bệnh “đen thân”.

Vi khuẩn *S. iniae* có khả năng dung huyết dạng β, âm tính với Catalase, Oxidase, O/F, không phát triển ở pH 9.6 và ở nhiệt độ 60°C. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây theo cẩm nang Cowan và Steel (1993), Ferguson, (1994) và Buller (2004). Ngoài ra, *S. iniae* phân lập trên cá rô bệnh “đen thân” phát triển ở nồng độ muối 6,5%. Đây là một đặc điểm sinh học rất đặc biệt của nhóm vi khuẩn này, có liên quan đến khả năng gây bệnh trên nhiều đối tượng nuôi ở cả vùng nước ngọt và mặn (Nagatsugawa, 1983 và Humphrey *et al.*, 1987).

Mặc dù *S. iniae* có các đặc điểm rất đặc trưng trong nhóm *Streptococcus*, nhiều tác giả

đã phát hiện đa số đặc điểm của *S. iniae* rất giống với *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Lau *et al.*, 2003 và Buller, 2004). Hơn nữa, cho đến nay các đặc điểm để định danh *S. iniae* không có trong cơ sở dữ liệu của các bộ kit định danh vi khuẩn như API 20 Strep, Rapid ID 32 Strep. Vì thế, chỉ dựa vào kết quả kit này để định danh vi khuẩn *S. iniae* là chưa phù hợp. Tuy nhiên, các chỉ tiêu trong các phản ứng sinh hóa trong bộ kit vẫn có thể được sử dụng để so sánh với kết quả của nhiều công trình nghiên cứu trước đây (Lau *et al.*, 2003 và Agnew và Barnes, 2007). Do đó, các kết quả định *S. iniae* trong nghiên cứu này phù hợp với các kết quả của Buller (2004) và nhiều tác giả khác. Việc ứng dụng sinh học phân tử giải trình tự gen 16S rRNA là cách tốt nhất trong việc định danh loài vi khuẩn này (Roach *et al.*, 2006 và El Aamri *et al.*, 2010).

Trong thí nghiệm gây cảm nhiễm, cá ở các nghiệm thức đối chứng vẫn hoạt động bình thường. Trong khi các nghiệm thức có tiêm chủng vi khuẩn *S. iniae*, cá rô giống nhiễm bệnh và chết có dấu hiệu lâm sàng giống với bệnh “đen thân” ngoài ao nuôi. Kết quả này đã thỏa mãn định đề Kochs. Trong thời gian thí nghiệm, nhiệt độ nước cao (28 - 29°C) là một trong những yếu tố làm cá dễ mắc cảm với *S. iniae* và tăng tỉ lệ cá chết. Điều này cũng được tìm thấy qua nghiên cứu của Agnew và Barnes (2007). Trong thí nghiệm này, giá trị LD<sub>50</sub> trên 2 chủng vi khuẩn trên cá rô đồng tương đối

cao  $10^3$  và  $10^5$  CFU/mL. Điều này phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đó trên cá rô phi ( $3.18 \times 10^5$  CFU) (Perera *et al.*, 1997) và cá chêm ( $2.0 \times 10^3$  CFU) (Bromage và Owens 2002). Trong nghiên cứu này, tất cả các chủng đều gây cá chết sau 48 giờ tiêm. Điều này phù hợp với thí nghiệm trước đây của Bromage *et al.* (1999), tác giả gây cảm nhiễm trên cá chêm *Lates calcarifer*, vi khuẩn *S. iniae* gây cá chết sau 18-24 giờ. Trong khi đó, nghiên cứu của El Aamri *et al.* (2010) cho thấy, cá tráp biển *Pagrus pagrus* nhiễm vi khuẩn *S. iniae* có biểu hiện lờ đờ và chết sau 72 giờ ở  $10^8$  CFU/mL. Sự khác nhau thời gian cá chết giữa các nghiên cứu tùy thuộc vào sự miễn dịch khác nhau của từng loài cá, độc lực của vi khuẩn cũng như các yếu tố môi trường, đặc biệt là nhiệt độ (Agnew và Barnes, 2007).

## 5 KẾT LUẬN

Vi khuẩn *Streptococcus iniae* Gram dương, hình cầu là tác nhân gây bệnh “đen thân” trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*). Cá bệnh có dấu hiệu bệnh lý: cơ thể cá có màu đen bất thường, mắt mờ đục và lồi, các cơ quan nội tạng sưng và xuất huyết. Kết quả cảm nhiễm xác định LD<sub>50</sub> trên 2 chủng vi khuẩn cảm nhiễm *S. iniae* S2FC4 và S8FC1 là  $3,73 \times 10^3$  CFU/mL sau 120h và  $2,43 \times 10^5$  CFU/mL sau 144h.

## LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí của đề tài Khoa học và Công nghệ cấp Bộ (Mã số: B2012-16-16) để hoàn thành nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agnew, W and A.C. Barnes, 2007. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*. 122: 1–15.
2. Barrow, I.G and R.K.A. Feltham (Editor), 1993. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, 3<sup>rd</sup> edn. Cambridge University Press. 351pp.
3. Buller, B.N, 2004. *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals- A Practical Identification Manual*. CABI Publishing. 390pp.
4. Bromage, S. E, A. Thomas and L. Owens, 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Disease of aquatic Organisms*. 36: 177-181.
5. Bromage, S. E and L. Owens, 2002. Infection of barramundi *Lates calcarifer* with *Streptococcus iniae*: effects of different routes of exposure. *Disease of aquatic Organisms*. 52: 199-205.
6. Creeper, H.J and N.B. Buller, 2006. An outbreak of *Streptococcus iniae* in barramundi (*Lates calcarifera*) in freshwater cage culture. *Australian Veterinary Journal*. 84: 408-411.
7. El Aamri, F, D. Padilla, F. Acosta, M.J. Caballero, J. Roo, J. Bravo, J. Vivas and F. Real, 2010. First report of *Streptococcus iniae* in red porgy (*Pagrus pagrus*, L.). *Journal of Fish Diseases*. 33: 901–905.
8. Ferguson, W, J.A. Morales and V.E. Ostland, 1994. Streptococcosis in aquarium fish. *Disease of aquatic Organisms*. 19: 1-6.
9. Frerichs, N.G and S.D. Millar, 1993. *Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens*. Pisces Press. U.K. 55pp.
10. Fishbase, 2010. <http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=495&genusname=Anabas&speciesname=testudineus&AT=anabas+testudineus&lang=Vietnamese>, truy cập ngày 17/12/2010.
11. Hatai, K and S. Egusa, 1979. Studies on the pathogenic fungus of mycotic granulomatosis-III. Development of the medium for MG-fungus. *Fish Pathology*. 13: 147-152.
12. Hoshina, T, T. Sano and Y. Morimoto, 1958. A *Streptococcus* pathogenic to fish. *Journal of the Tokyo University of Fisheries*. 44: 57-68.
13. Humphrey, J. D, C. E. Lancaster, N. Gudkovs and J. W. Copland, 1987. The disease status of Australian salmonids: bacterial and bacteria diseases. *Journal of Fish Disease*. 10: 403-410.
14. Lau, P.K.S, P.C.Y. Woo, H. Tse, K.W. Leung, S.S.Y. Wong and K.Y. Yuen, 2003. Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1004–1009.
15. Noga, J. E (Editor), 2010. *Fish disease- diagnosis and treatment* (2<sup>nd</sup> Edition). John Wiley & Sons. 538pp.

16. Nagatsugawa, T, 1983. A streptococcal disease of culture flounder. *Fish pathology*. 17: 281-285.
17. Pasnik, J.D, J.J. Evans and P.H. Klesius, 2009. Fecal strings associated with *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *The Open Veterinary Science Journal*. 3: 6-8.
18. Pier, B.G and S.H. Madin, 1976. *Streptococcus iniae* sp. nov., a Beta-Hemolytic *Streptococcus* isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *International journal of Systematic Bacteriology*. 26: 545-553.
19. Perera, P.R, S.K. Johnson and D.H. Lewis, 1997. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. *Aquaculture*. 152 (1-4): 25-33.
20. Reed, J.L and H.A. Muench, 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *The American journal of Hygiene*. 27(3): 493-497.
21. Romalde, L. J, B. Magariños, C. Ravelo and A.E. Toranzo, 2009. Vaccination Strategies to Prevent Streptococcal Infections in Cultured Fish. In: G. Zaccane, C. Perrière, A. Mathis and B.G. Kapoor (Editor). *Fish Defenses*. Vol (2) Pathogens, Parasites and Predators. Science Publishers. 403pp.
22. Roach, J.C, P.N. Levett and M.C. Lavoie, 2006. Identification of *Streptococcus iniae* by commercial bacterial identification systems. *Journal of Microbiology Methods*. 27: 20–26.