

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG GÂY BỆNH CỦA VI KHUẨN *Streptococcus agalactiae* SEROTYPE Ia và III TRÊN CÁ RÔ PHI TRONG ĐIỀU KIỆN THỰC NGHIỆM

Đoàn Thị Ninh^{1,4}, Nguyễn Vũ Sơn², Đặng Thị Hóa¹, Nguyễn Thị Thuý Hằng³,
Ngô Phú Thoà¹, Nguyễn Thị Hương Giang², Kim Văn Vạn¹, Đặng Thị Lụa⁴, Trương Đình Hoài^{1*}

¹Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Trường Cán bộ Quản lý Nông nghiệp và Phát triển nông thôn

⁴Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I

*Tác giả liên hệ: tdhoai@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 20.06.2023

Ngày chấp nhận đăng: 05.10.2023

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* serotype Ia và III trên cá rô phi. Để thực hiện nghiên cứu 10 chủng *S. agalactiae* phân lập tại miền Bắc năm 2022 được lựa chọn ngẫu nhiên để định danh bằng phương pháp sinh hoá, giám định bằng PCR và sử dụng kỹ thuật multiplex PCR để xác định kiểu serotype. Kết quả cho thấy trong số 10 chủng vi khuẩn định danh được, có 7 chủng thuộc *S. agalactiae* thuộc serotype Ia (ST Ia) và 3 chủng thuộc serotype III (ST III). Kết quả cảm nhiễm trên cá rô phi cho từng serotype cho thấy chủng ST III gây chết sớm và nhanh hơn so với serotype Ia, tuy nhiên tỉ lệ chết tích lũy sau 14 ngày theo dõi không có sự khác biệt giữa hai serotype. Giá trị LD₅₀ của chủng ST Ia và ST III lần lượt là $2,5 \times 10^4$ CFU/cá và $1,9 \times 10^4$ CFU/cá. Kết quả đánh giá triệu chứng, bệnh tích đại thể và biến đổi mô học trên cá cảm nhiễm chủng ST Ia và ST III không có sự khác biệt đáng kể. Đây là nghiên cứu đầu tiên xác định sự có mặt của serotype Ia và III gây bệnh trên cá rô phi và đánh giá khả năng gây bệnh trong điều kiện thực nghiệm.

Từ khoá: *Streptococcus agalactiae*, serotype, đặc điểm bệnh lý, rô phi, Việt Nam.

Evaluation of the Pathogenicity of *Streptococcus Agalactiae* Serotype Ia and III in Tilapia under Experimental Challenges

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* serotypes Ia and III causing disease in tilapia. A total of 10 isolates of suspected *S. agalactiae* retrieved from diseased tilapia in northern Vietnam in 2022 were used for identification by biochemical method and by PCR assays and serotyping by multiplex PCR. The results revealed that of 10 identified isolates of *S. agalactiae* seven isolates belonged to serotype III (ST III) and three others belonged to serotype Ia (ST Ia). The experimental challenges on tilapia of the representative of each serotype showed that fish infected with the ST III isolates caused early and faster death than those of the ST Ia isolates. However, there existed no significant difference in the cumulative mortalities of 14 dpi between the two serotypes. The LD₅₀ of the ST Ia and ST III isolates were at 2.5×10^4 and 1.9×10^4 CFU/fish, respectively. The clinical signs and gross and histopathological lesions of experimentally infected fish between serotype Ia or III were also similar. The circulation of *S. agalactiae* ST Ia and ST III in Vietnam was reported for the first time in this study and their pathogenicity was characterized in laboratory scale.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, serotype, pathogenicity, tilapia, Vietnam.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Streptococcus agalactiae là vi khuẩn thuộc

nhóm B Streptococci (GBSs), gây bệnh trên cá động vật thủy sinh và động vật trên cạn (Evans & cs., 2008). Tuy đã được biết đến từ lâu nhưng

tác nhân gây bệnh này vẫn đang được quan tâm nghiên cứu và được coi là bệnh rất nguy hiểm đối với các đối tượng nuôi thủy sản, đặc biệt là cá rô phi do bệnh gây chết trên diện rộng và tỉ lệ chết rất cao (Zhang & cs., 2013; Zhang & cs., 2018). Bùng phát bệnh do *S. agalactiae* trên cá rô phi đã được báo cáo ở hầu hết các nước nuôi cá rô phi thế giới, đặc biệt ở những nước nuôi cá rô phi chủ lực như Trung Quốc, Israel, Thailand, Indonesia, Brazil (Mian & cs., 2009; Suanyuk & cs., 2008; Zhang & cs., 2008). Tỉ lệ chết ghi nhận được lên đến 70% sau thời gian ngắn nhiễm bệnh, bệnh bùng phát mạnh khi nhiệt độ môi trường nuôi tăng cao trên 30°C (Najiah & cs., 2012).

Vi khuẩn *S. agalactiae* được phân thành các kiểu serotype khác nhau dựa trên cấu trúc polysaccharide (CPS) của lớp vỏ capsule (Imperi & cs., 2010; Poyart & cs., 2007). Theo đó 10 nhóm serotype riêng biệt đã được nhận dạng bao gồm Ia, Ib và từ II - IX. Mỗi serotype có đặc tính độc lực và khả năng gây bệnh khác nhau (Imperi & cs., 2010). Cho đến nay, 5 kiểu serotype đã được xác định trên các chủng *S. agalactiae* gây bệnh trên động vật thủy sản, bao gồm Ia, Ib, III, IX và IV (Li & cs., 2013; Zhang & cs., 2018; Delannoy & cs., 2021). Trong đó serotype Ia và III gây bệnh trên nhiều loài ký chủ bao gồm cả trên người và trên cá, trong đó chủng ST 283 thuộc serotype III được cho là có khả năng gây bệnh trên người khi sử dụng sản phẩm thủy sản nhiễm bệnh (Barkham & cs. 2019). Chủng serotype Ib đã gây bệnh trên nhiều loài cá nước ngọt và nước mặn trên thế giới (Rosinski-Chupin & cs., 2013). Trong khi đó, serotype IV trước đây chỉ gây bệnh trên người, đã lần đầu tiên được phát hiện gây bệnh trên cá rô phi ở Nam Phi năm 2021 (Delannoy & cs., 2021). Mức độ lưu hành và chiếm ưu thế của các serotype gây bệnh trên cá rô phi có sự khác nhau giữa các khu vực nuôi. Các thông tin về kiểu serotype đang lưu hành ở các hệ thống nuôi và đặc điểm độc lực của vi khuẩn là nền tảng quan trọng trong quá trình phát triển, lựa chọn loại vacxin phù hợp và xây dựng được phương pháp phòng và kiểm soát bệnh phù hợp.

Tại Việt Nam, vi khuẩn *S. agalactiae* được phát hiện gây bệnh trên cá rô phi nuôi ở một số

tỉnh miền Bắc từ năm 2009. Các công bố chính thức về tác nhân gây bệnh này sau đó được thực hiện bởi các nhóm tác giả Đặng Thị Hoàng Oanh & Nguyễn Thanh Phương (2012) ở Tiền Giang; Trương Đình Hoài & cs. (2014) ở một số khu vực nuôi miền Bắc và Nguyễn Ngọc Phước & cs. (2019) ở một số vùng nuôi tại Thừa Thiên Huế. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu chỉ ở mức nhận diện biểu hiện bệnh và định danh tác nhân gây bệnh bằng phương pháp sinh hoá mà chưa cập nhật các phương pháp định danh mới, cũng như chưa khai thác các khía cạnh khác của bệnh. Thông tin về sự lưu hành của serotype, độc lực và khả năng gây bệnh của các serotype đang lưu hành ở Việt Nam, đặc biệt là khu vực miền Bắc hiện nay rất hạn chế. Nghiên cứu này nhằm bước đầu xác định các serotype của vi khuẩn *S. agalactiae* đang lưu hành và gây bệnh cho cá rô phi tại một số vùng nuôi tại miền Bắc, đồng thời đánh giá và so sánh độc lực giữa các serotype trong điều kiện thực nghiệm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập từ cá rô phi; Cá rô phi khỏe phục vụ thí nghiệm cảm nhiễm, các trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất phục vụ nuôi cấy phục hồi, định danh, xác định kiểu serotype và cảm nhiễm vi khuẩn.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nuôi cấy phục hồi và giám định vi khuẩn

Chọn ngẫu nhiên 10 chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* được lưu giữ trong glyceron ở điều kiện -80°C. Đây là các chủng vi khuẩn phân lập được từ cá rô phi nhiễm *S. agalactiae* thu ở một số trại nuôi miền Bắc năm 2022 tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Vi khuẩn được nuôi cấy phục hồi trên môi trường TSA (Tryptic Soy Agar, Merck, Đức) và giám định lại bằng phương pháp sinh hóa và PCR. Hình dạng vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi sau nhuộm gram, tính di động của vi khuẩn được soi tươi dưới kính hiển vi; các phép

thử catalase, oxidase được thực hiện theo hướng dẫn của Gagnon & cs. (1959) và Hugh & Leifson (1953). Một số đặc tính sinh hóa khác được đánh giá bằng bộ kit thử API 20 Strep (Biomérieux, Pháp) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, kết quả được đọc sau 24h thử.

Các chủng vi khuẩn sau định danh thành công bằng phương pháp sinh hoá được tách chiết DNA để giám định bằng kỹ thuật PCR. DNA của vi khuẩn thuần được tách bằng bộ kit Instagen Matrix (Bio-rad, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Quá trình giám định PCR vi khuẩn *S. agalactiae* sử dụng primer đặc hiệu, xác định sự có mặt của gene đích *Cfb* với trình tự đoạn xuôi F:AAGCGTGTATTCCAGATTTCCCT và mũi ngược R:CAGTAATCAAGCCAGCAA, kích cỡ vùng gen đích là 474bp (Li & cs., 2010). Hỗn dịch cho phản ứng PCR có thể tích tổng 20µl bao gồm 10µl GoTaq Green Master Mix (Promega, UK), 1,5µl mỗi primer xuôi và ngược (nồng độ 10µM), 3µl mẫu DNA vi khuẩn, 4µl nước tách DNA. Đối chứng dương là chủng chuẩn quốc tế *S. agalactiae* ATCC 51487, đối chứng âm là mẫu không DNA. Chu trình nhiệt được thiết đặt theo hướng dẫn của (Li & cs., 2010).

Sản phẩm khuếch đại DNA được phân tích trên máy điện di sử dụng bản gel chứa 1,3% agarose được nhuộm bằng dung dịch Redsafe (Intron, Hàn Quốc). Hình ảnh điện di bản gel được chụp bằng thiết bị analytikjena (Upland, USA).

2.2.2. Xác định kiểu serotype

Quá trình xác định kiểu serotype được thực hiện trên tất cả các chủng *S. agalactiae* đã được định danh thành công, sử dụng phương pháp phát hiện các cụm gene *cps* bằng kỹ thuật PCR multiplex (PCR đa mũi) theo phương pháp của Imperi & cs. (2010) với một số điều chỉnh (Bảng 1). Trong nghiên cứu, 5 kiểu serotype đã được phát hiện gây bệnh trên cá rô phi bao gồm ST Ia, ST III, ST Ib, ST IV và ST IX được tập trung nghiên cứu sử dụng các đoạn mũi đặc hiệu khuếch đại 4 gene *cps*: *cpsL* (*cpsL-F*, *cpsL-R*), *cpsG* (*cpsG-F*, *cpsG-R*, *cpsG-2-3-6-R*), *cpsJ* (*cpsJ-2-4-F*, *cpsJ-4-R*, *cpsJ-Ib-F*, *cpsJ-Ib-R*) và *cpsI* (*cpsI-Ia-6-7-F*, *cpsI-7-9-F*, *cpsI-9-R*). Các

serotype còn lại (ST II, ST V, ST VI, ST VII, ST VIII) cũng được kiểm tra để xác định khả năng xuất hiện kiểu serotype khác sử dụng các đoạn mũi khuếch đại các gene *cpsL* (*cpsL-F*, *cpsL-R*), *cpsN* (*cpsN-5-F*, *cpsN-5-R*), *cpsG* (*cpsG-F*, *cpsG-R*, *cpsG-2-3-6-R*), *cpsI* (*cpsI-Ia-6-7-F*, *cpsI-6-R*, *cpsI-7-R*), *cpsJ* (*cpsJ-8-F*, *cpsJ-8-R*).

Hỗn dịch thực hiện phản ứng PCR đa mũi xác định sự có mặt của 5 kiểu serotype ST Ia, ST III, ST Ib, ST IV và ST IX có tổng thể tích là 35µl, bao gồm 3µl DNA vi khuẩn, 10µl GoTaq Green Master Mix (Promega, UK), 1,5µl (10µM) mỗi đoạn mũi trong số 12 đoạn mũi (Biorad, USA) và 4µl nước tách DNA. DNA được khuếch đại với chu trình nhiệt được mô tả trong bảng 1. Thực hiện tương tự với hỗn dịch phản ứng xác định các serotype còn lại.

Quá trình điện di được thực hiện tương tự như trong mục 2.2.1. Chủng vi khuẩn được xác định thuộc một trong số các serotype khi xuất hiện các vạch band tương ứng theo mô tả của Imperi & cs., (2010) trong bảng 2.

2.2.3. Phương pháp cảm nhiễm

Chuẩn bị vi khuẩn: Từ mỗi kiểu serotype xác định được, lựa chọn ngẫu nhiên 01 chủng vi khuẩn đại diện để thực hiện thí nghiệm cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm nhằm so sánh khả năng gây bệnh trên cá rô phi. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường TSB (Tryptic Soy Broth, Merck, Đức) ở 28°C trong 36h. Mật độ vi khuẩn sau nuôi cấy được điều chỉnh về khoảng 1×10^8 CFU/ml bằng phương pháp đo mật độ quang (OD600), kết hợp cấy trên đĩa thạch. Dịch khuẩn sau đó được pha loãng tạo thành dãy nồng độ từ 1×10^2 đến 1×10^8 CFU/ml để tiêm cảm nhiễm cho cá.

Chuẩn bị cá rô phi thí nghiệm: Cá rô phi khỏe mạnh ($n = 480$), khối lượng 25-30 g/con được sử dụng cho quá trình cảm nhiễm. Cá được vận chuyển kín từ trại giống về phòng thí nghiệm và được nuôi thuần ở bể thể tích 1 m³ trong thời gian 1 tuần trước khi tiêm cảm nhiễm. Bể nuôi được bố trí sục khí vừa phải và đảm bảo các yếu tố môi trường trong khoảng phù hợp cho cá sinh trưởng. Cá được cho ăn cám công nghiệp 2 lần/ngày và theo dõi sức khỏe trong suốt thời gian nuôi thuần. Trước khi đưa

vào cảm nhiễm, bắt ngẫu nhiên 5 con cá để kiểm tra, đánh giá lâm sàng, các triệu chứng và bệnh tích bất thường. Một số mẫu cá được lựa chọn ngẫu nhiên để nuôi cấy, phân lập vi khuẩn từ gan, thận, lách. Cá đưa vào thí nghiệm cảm nhiễm đảm bảo không có biểu hiện bệnh lý bất thường và không có vi khuẩn phát triển sau nuôi cấy.

Thiết kế hệ thống và tiến hành thí nghiệm:
Đối với mỗi chủng vi khuẩn, bố trí thí nghiệm hoàn toàn ngẫu nhiên với 7 lô tiêm dịch vi khuẩn ở các nồng độ từ 1×10^2 đến 1×10^8 CFU/ml và 1 lô đối chứng tiêm PBS. Với mỗi nồng độ vi khuẩn, tiến hành tiêm 10 con với lượng 0,1ml dịch khuẩn/cá vào xoang bụng cá và được nuôi theo dõi trong các bể có thể tích 120 lít. Mỗi nồng độ tiêm được bố trí lặp lại 3 lần (Hình 1).

Cá sau tiêm được nuôi theo dõi 14 ngày ở điều kiện nhiệt độ phù hợp ($33 \pm 1^\circ\text{C}$) với khả năng gây bệnh của vi khuẩn *S. agalactiae*. Các yếu tố môi trường được duy trì đảm bảo giống nhau ở các bể thí nghiệm và trong khoảng phù hợp với sự phát triển bình thường của cá rô phi

(pH 7-7,5; $\text{NO}_2 = 0$ mg/l, $\text{NH}_3 < 0,01$ mg/l). Số lượng cá chết hàng ngày được ghi chép và theo dõi để xác định tỉ lệ chết tích lũy sau cảm nhiễm. Cá nhiễm bệnh được quan sát biểu hiện bệnh và giải phẫu để xác định các triệu chứng, bệnh tích. Độc lực và khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn thuộc các serotype khác nhau được đánh giá dựa trên so sánh giá trị LD_{50} , tỉ lệ chết tích lũy sau 14 ngày cảm nhiễm và biến đổi mô bệnh học.

Phương pháp xác định liều gây chết 50% (LD_{50})

Liều gây chết 50% cá thí nghiệm (LD_{50} , lethal dose) được xác định theo công thức của Reed & Muench (1938) như sau:

$$\text{LD}_{50} = 10^{(a-x)}$$

Trong đó:

a: Nồng độ vi khuẩn gây chết cá thí nghiệm với tỉ lệ cận trên 50%;

$$x = (\text{Pa} - 50)/(\text{Pa} - \text{Pu}).$$

Pa, Pu: Tỉ lệ cá chết cận trên và cận dưới của ngưỡng chết 50%.

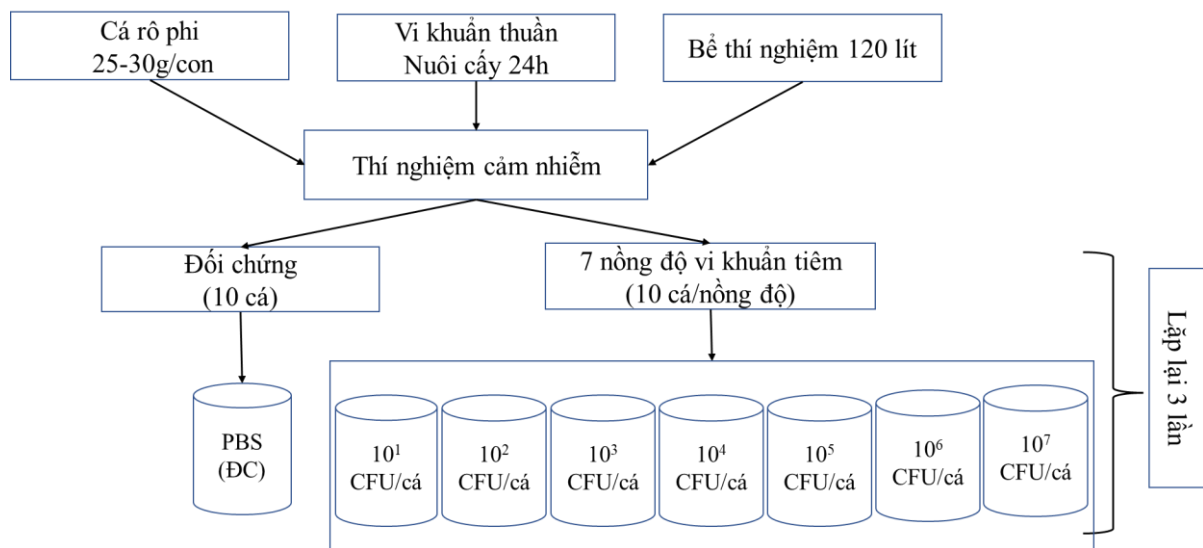
Bảng 1. Trình tự môi sử dụng để xác định kiểu serotype của vi khuẩn *S. agalactiae* trong nghiên cứu (theo Imperi & cs., 2010)

Genes	Trình tự môi (5' → 3')	Chu trình nhiệt
<i>cpsI</i> -la-6-7-F	GAATTGATAACTTTTGTGGATTGCGATGA	(i) 94°C, 5 phút
<i>cpsI</i> -6-R	CAATTCTGTCGGACTATCCTGATG	<u>Bước 1</u> (ii)
<i>cpsI</i> -7-R	TGTCGCTTCCACACTGAGTGTTGA	95°C, 1 phút
<i>cpsL</i> -F	CAATCCTAAGTATTTTCGGTTCATT	54°C, 1 phút
<i>cpsL</i> -R	TAGGAACATGTTCAATTAACATAGC	72°C, 2 phút
<i>cpsG</i> -F	ACATGAACAGCAGTTCAACCGT	25 chu kỳ
<i>cpsG</i> -R	ATGCTCTCCAACTGTTCTTGT	<u>Bước 2</u> (iii)
<i>cpsG</i> -2-3-6-R	TCCATCTACATCTTCAATCCAAGC	95°C, 1 phút
<i>cpsN</i> -5-F	ATGCAACCAAGTGATTATCATGTA	56°C, 1 phút
<i>cpsN</i> -5-R	CTCTTCACTCTTTAGTGAGGTAT	72°C, 2 phút
<i>cpsJ</i> -8-F	TATTTGGGAGGTAATCAAGAGACA	25 chu kỳ
<i>cpsJ</i> -8-R	GTTTGGAGCATTCAAGATAACTCT	<u>Bước 3</u> (iv)
<i>cpsJ</i> -2-4-F	CATTTATTGATTGACGATTACATTGA	72°C, 10 phút
<i>cpsJ</i> -2-R	CCTCTTTCTCTAAATATTTCAACC	
<i>cpsJ</i> -4-R	CCTCAGGATATTTACGAATTCTGTA	
<i>cpsI</i> -7-9-F	CTGTAATTGGAGGAATGTGGATCG	
<i>cpsI</i> -9-R	AATCATCTTCATAATTTATCTCCCAT	
<i>cpsJ</i> -Ib-F	GCAATTCTTAACAGAATATTCAGTTG	
<i>cpsJ</i> -Ib-R	GCGTTTCTTTATCACATACTCTTG	

Đánh giá khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* serotype Ia và III trên cá rô phi trong điều kiện thực nghiệm

Bảng 2. Kích cỡ (bp) sản phẩm khuếch đại DNA trong phản ứng PCR tương ứng với từng kiểu serotype vi khuẩn *S. agalactiae* (Imperi & cs. 2010)

Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
688bp (cpsL)	688bp (cpsL) 621bp (cpsJ)	688bp (cpsL)	688bp (cpsL)	688bp (cpsL)	688bp (cpsL)	688bp (cpsL)	688bp (cpsL)	688bp (cpsL)	688bp (cpsL)
				538bp (cpsJ)	582bp (cpsN)				
		465bp (cpsJ)				470bp (cpsI)			
			352bp (cpsG)			352bp (cpsG)		438bp (cpsJ)	
272bp (cpsG)	272bp (cpsG)	272bp (cpsG)		272bp (cpsG)	272bp (cpsG)		272bp (cpsG)		272bp (cpsG)
									229bp (cpsI)
							179bp (cpsI)		



Hình 1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm cảm nhiễm cho 1 chủng vi khuẩn

2.2.4. Nghiên cứu mô bệnh học

Từ mỗi lô thí nghiệm cảm nhiễm, tiến hành thu ngẫu nhiên 03 mẫu cá có dấu hiệu bệnh đặc trưng, còn sống ở từng nồng độ cảm nhiễm và ở lô đối chứng. Các mẫu mô được thu gồm gồm não, gan, lách, thận và ruột được thu để làm tiêu bản mô học. Quá trình xử lý mẫu mô bệnh

được thực hiện theo hướng dẫn của Morrison & cs. (2007). Mẫu được cố định trong buffer formalin 10% (pH 6,8-7,2), sau đó được đúc parafin, cắt thành các tiêu bản có độ dày < 5µm, nhuộm bằng thuốc nhuộm hematoxylin và eosin (H&E). Biến đổi mô bệnh học trên các tiêu bản được đánh giá và so sánh sử dụng kính hiển vi quang học.

2.2.5. Xử lý số liệu

Số liệu về tỉ lệ chết tích lũy của cá trong quá trình cảm nhiễm được phân tích thống kê mô tả trên phần mềm Excel 2013 với các giá trị ở dạng giá trị trung bình $\pm$ SD.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nuôi cấy phục hồi và định danh vi khuẩn

Tất cả 10 chủng vi khuẩn nuôi cấy phục hồi đều phát triển tốt trên thạch TSA. Đây là một số chủng vi khuẩn phân lập từ mẫu cá rô phi có biểu hiện lồi mắt, xuất huyết đặc trưng do nhiễm *S. agalactiae* thu ở một số trại nuôi miền Bắc năm 2022. Các chủng vi khuẩn thuần có các đặc điểm hình thái, sinh hoá tương đồng nhau. Khuẩn lạc vi khuẩn có màu trắng, hình tròn, kích cỡ nhỏ, khoảng 0,1-0,5mm, phát triển sau 36h nuôi cấy. Vi khuẩn thuần thuộc nhóm Gram (+), hình cầu với đường kính khoảng 0,5-1µm, liên kết với nhau thành cặp hoặc dạng chuỗi ngắn, không di động (Hình 2).

Một số đặc tính sinh hoá khác của các chủng vi khuẩn khi thử bằng kit API 20 Strep được thể hiện trong bảng 3. Các đặc điểm hình thái, sinh hoá của các chủng vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu đều tương đồng với kết quả ghi nhận được đối với chủng chuẩn *S. agalactiae* ATCC 51487. Mười chủng vi khuẩn phát triển sau nuôi cấy phục hồi đều được định danh là *Streptococcus agalactiae* khi tra cứu kết quả đặc tính sinh hoá trên hệ thống định danh APIweb.

Kết quả giám định bằng PCR cho thấy 10 chủng vi khuẩn đều dương tính với đoạn gene đặc hiệu xác định loài *S. agalactiae*. Điện di sản phẩm khuếch đại DNA cho vạch band ở vị trí 474bp, trùng với vạch band của chủng đối chứng dương *S. agalactiae* ATCC 51487 (Hình 3). Kết quả giám định PCR khẳng định 10 chủng này là *S. agalactiae*.

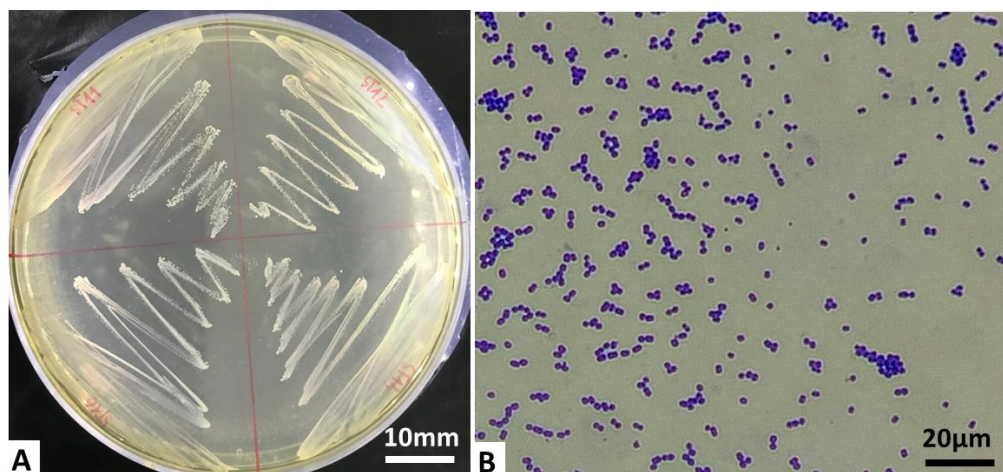
3.2. Kết quả xác định serotype của *S. agalactiae*

Kết quả xác định kiểu serotype bằng kỹ

thuật multiplex PCR cho thấy, 10 chủng *S. agalactiae* thuộc hai serotype Ia và III, trong đó serotype Ia chiếm ưu thế với 7/10 và chỉ có 3/10 chủng thuộc serotype III. Không có serotype nào khác được phát hiện ngoài hai kiểu Ia và III. Trên bản gel điện di sản phẩm khuếch đại, serotype Ia xuất hiện hai band 688bp và 272bp, trong khi serotype III xuất hiện hai vạch band: 688bp và 352bp (Hình 4).

Như vậy sơ bộ cho thấy *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi ở một số trại nuôi miền Bắc lưu hành ít nhất hai kiểu serotype là ST Ia và ST III. Hai serotype này cũng được công bố gây bệnh trên cá rô phi nuôi ở một số nước như Thái Lan, Trung Quốc, Brazil, Malaysia (Kannika & cs., 2017; Kayansamruaj & cs., 2019; Li & cs., 2014; Syuhada & cs., 2020). Tuy nhiên, mức độ lưu hành từng serotype có sự khác biệt giữa các nước. Serotype Ia lưu hành chiếm ở các hệ thống nuôi cá rô phi tại Trung Quốc gần đây (Zhang & cs., 2018), tại Thái Lan (Kannika & cs., 2017), Indonesia (Zhang & cs., 2013). Trong khi đó, kiểu ST III chiếm ưu thế ở Malaysia (89%) (Syuhada & cs., 2020), nhưng chiếm tỉ lệ thấp ở Thái Lan (Kannika & cs., 2017) và Trung Quốc (Li & cs., 2013). Ngoài hai kiểu serotype này, một số serotype khác cũng được ghi nhận nhiễm trên cá rô phi ở nhiều nước khác, mà chưa phát hiện trong số các chủng nghiên cứu. Ví dụ, kiểu Ib lưu hành chiếm ưu thế ở các vùng nuôi tại Brazil (Godoy & cs., 2013), kiểu ST IV gần đây được phát hiện ở North Africa (Delannoy & cs., 2021) và kiểu IX đã có mặt ở hệ thống nuôi tại Trung Quốc (Zhang & cs., 2018). Trong nghiên cứu này, trong số lượng 10 chủng *S. agalactiae* phân lập tại miền Bắc cho thấy serotype Ia chiếm ưu thế, khác biệt so với kiểu serotype chiếm ưu thế đang lưu hành và gây bệnh trên nhiều loài cá có vảy nuôi ở khu vực sông Mekong là serotype III (Sirimanapong & cs. 2023). Tuy nhiên cần có những nghiên cứu với số lượng chủng lớn hơn, vùng thu mẫu rộng hơn để đánh giá toàn diện về mức độ lưu hành của các serotype khác nhau đang lưu hành và gây bệnh trên cá rô phi ở Việt Nam.

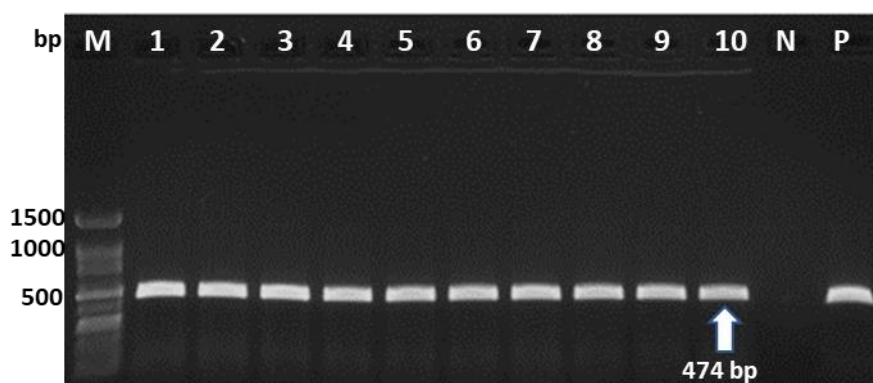
Đánh giá khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* serotype Ia và III trên cá rô phi trong điều kiện thực nghiệm



Hình 2. Vi khuẩn thuần phát triển khi được nuôi cấy phục hồi trên thạch TSA (A) và hình dạng vi khuẩn khi nhuộm Gram (B)

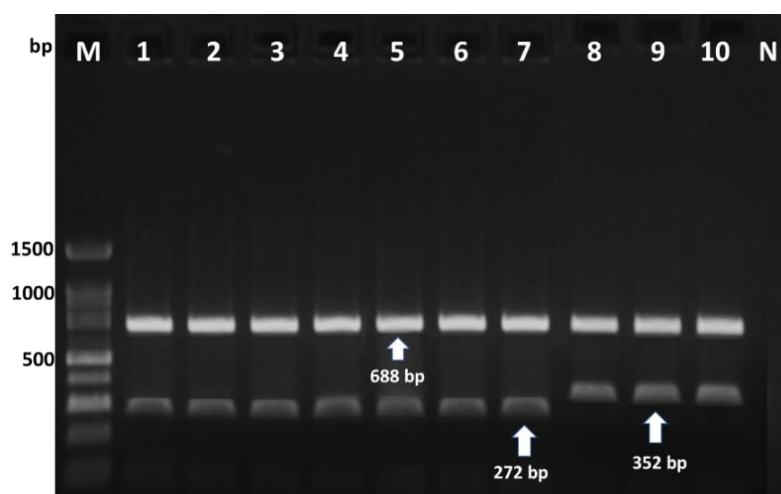
Bảng 3. Đặc tính hình thái và sinh hoá của vi khuẩn phân lập từ mẫu cá rô phi

Chỉ tiêu hình thái, sinh hoá	Kết quả thử (10 chủng vi khuẩn phân lập từ cá rô phi)	Chủng chuẩn <i>S. agalactiae</i> ATCC 51487
Gram	(+)	(+)
Di động	-	-
Hình dạng	Liên cầu	Liên cầu
VP (Voges Proskauer)	+	+
HIP (HIPpuric acid)	+	+
ESC (ESculin)	-	-
PYRA (PYRrolidonyl Arylamidase)	-	-
α GAL (α -GALactosidase)	-	-
β GUR (β -GIUcRonidase)	-	-
β GAL (β -GALactosidase)	-	-
PAL (ALKaline Phosphatase)	+	+
LAP (Leucine AminoPeptidase)	+	+
ADH (Arginine DiHydrolase)	+	+
RIB (RIBose)	+	+
ARA (ARABinose)	-	-
MAN (MANnitrol)	-	-
SOR (SORbitol)	-	-
LAC (LACTose)	-	-
TRE (TREhalose)	+	+
INU (INULin)	-	-
RAF (RAFFinose)	-	-
AMD (AmiDon)	-	-
GLYG (GLYcoGen)	-	-
Tán huyết σ	2/10 chủng	-
Tán huyết β	8/10 chủng	+



Ghi chú: M: Marker (100-1.500bp, Cleaver Scientific, UK), giếng 1-10: 10 chủng vi khuẩn nuôi cấy phục hồi phân lập từ cá nhiễm *S. agalactiae* trong nghiên cứu; N: Đối chứng âm; P: Đối chứng dương.

Hình 3. Kết quả giám định PCR định danh vi khuẩn *S. agalactiae*



Ghi chú: M: Marker (100-1.500bp, Cleaver Scientific, UK); 1-7: Chủng serotype Ia (vạch band 688 và 272bp); 8-10: Chủng serotype III (vạch band 688 và 352 bp); N: Đối chứng âm.

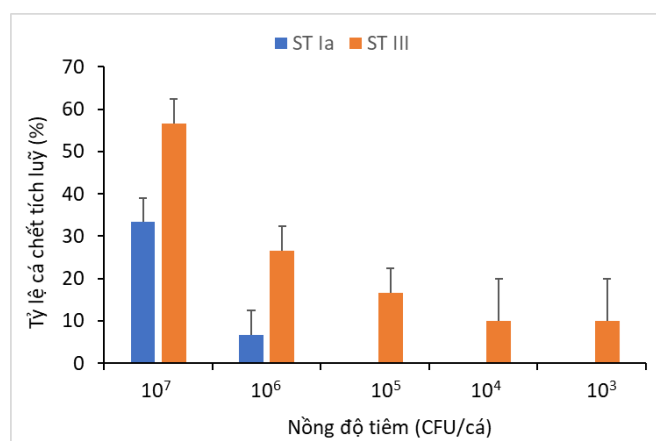
Hình 4. Ảnh điện di sản phẩm khuếch đại DNA xác định serotype 10 chủng vi khuẩn *S. agalactiae*

3.3. So sánh kết quả cảm nhiễm của *S. agalactiae* serotype Ia và III

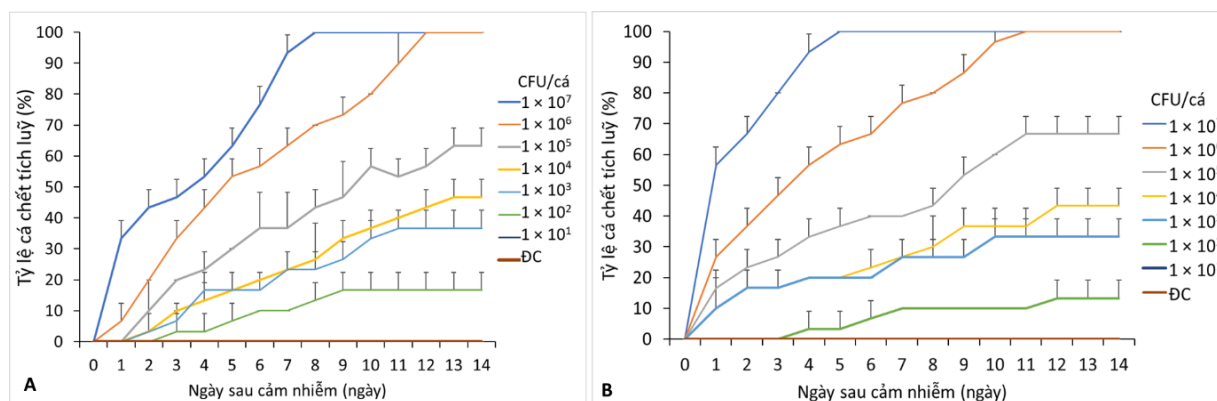
Đối với lô tiêm chủng ST Ia, sau 24 giờ, chỉ xuất hiện cá chết ở hai lô tiêm nồng độ cao nhất (10^7 và 10^6 CFU/cá), với tỉ lệ tương ứng là 33,3% và 6,7%, các bể tiêm nồng độ thấp hơn, cá bắt đầu chết sau 2-3 ngày tiêm (Hình 5, Hình 6A). Tỉ lệ cá chết tăng nhanh sau 4-5 ngày, chết hoàn toàn ở lô tiêm 10^7 và 10^6 CFU/cá vào khoảng 8-12 ngày sau tiêm, các lô còn lại có tỉ lệ chết từ 16,7-63,3% sau 14 ngày tiêm.

Đối với chủng ST III, khi sử dụng mật độ tiêm cao nhất (10^7 CFU/cá), cá chết rất nhanh sau tiêm 8-10h, tỉ lệ chết lên tới 56,7% ngay sau 24h tiêm và chết hoàn toàn sau 5 ngày cảm nhiễm (Hình 5, Hình 6B). Các lô tiêm mật độ vi khuẩn thấp hơn (10^6 , 10^5 và 10^4 , 10^3 CFU/cá), đều có từ 10-26,7% cá chết sau 24 h tiêm, tỉ lệ chết tăng dần và đạt mức tương ứng 100%; 66,7%, 43,3% và 33,3% sau 14 ngày tiêm. Lô tiêm 10^2 CFU/cá, cá chết sau 4 ngày tiêm và tỉ lệ chết là 13,3% sau 14 ngày theo dõi, trong khi nồng độ tiêm 10^1 CFU/cá, không gây chết cá thí nghiệm.

Đánh giá khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* serotype Ia và III trên cá rô phi trong điều kiện thực nghiệm



Hình 5. Tỷ lệ chết của cá sau 24h tiêm bằng chủng vi khuẩn ST Ia và ST III



Hình 6. Kết quả theo dõi tỷ lệ chết tích lũy của cá rô phi sau tiêm cảm nhiễm bằng chủng ST Ia (A) và chủng ST III (B)

Kết quả phân tích liều gây chết LD_{50} cho thấy Giá trị LD_{50} của chủng ST Ia và ST III lần lượt là $2,5 \times 10^4$ CFU/cá và $1,9 \times 10^4$ CFU/cá. Sau 14 ngày tiêm, tỷ lệ chết tích lũy của ở các nồng độ tiêm giữa hai chủng vi khuẩn serotype Ia và III không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (t test, $P = 0,3506$).

Kết quả cảm nhiễm cho thấy mặc dù chủng vi khuẩn ST Ia và ST III gây chết trên cá rô phi với xu hướng khác nhau, đặc biệt là khả năng gây chết nhanh trong ngày đầu cảm nhiễm của serotype ST III so với ST Ia (Hình 5), nhưng tỷ lệ chết tích lũy không có sự khác biệt khi kết thúc thí nghiệm. Theo Syuhada & cs. (2020), vi khuẩn ST III mang nhiều gene độc lực mã hoá cho khả năng gắn bám của vi khuẩn hơn so với chủng ST Ia. Khả năng này có thể giúp chủng ST III gắn bám tốt hơn và xâm nhập vào các cơ

quan trọng cơ thể cá nhanh hơn so với chủng Ia ngay sau khi tiêm, từ đó gây chết sớm và với tỷ lệ cao hơn trong giai đoạn đầu sau tiêm. Tuy nhiên, tỷ lệ chết tích lũy sau 14 ngày tiêm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai chủng vi khuẩn, thể hiện khả năng gây chết không có sự khác biệt lớn giữa chủng vi khuẩn ST Ia và ST III. Kết quả này phù hợp với nhận định của các tác giả trước, khi cho rằng khả năng gây bệnh của vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi không phụ thuộc vào kiểu serotype (Mian & cs., 2009; Suanyuk & cs., 2008). Tuy nhiên nghiên cứu của Suwannasang & cs. (2014) không ghi nhận kết quả theo cùng xu hướng này khi báo cáo serotype Ia có độc lực cao hơn so với serotype III. Ở loài cá khác, nhóm tác giả Kim & cs. (2015) chứng minh rằng trên cá zebrafish, chủng ST III gây tỷ lệ chết cao hơn so với chủng

ST Ia. Điều đó cho thấy rằng mức độ độc lực của *S. agalactiae* có thể không được quyết định bởi serotype mà phụ thuộc vào một số yếu tố khác như sự miễn dịch của cá với tác nhân gây bệnh, kích cỡ cá cảm nhiễm, điều kiện môi trường.

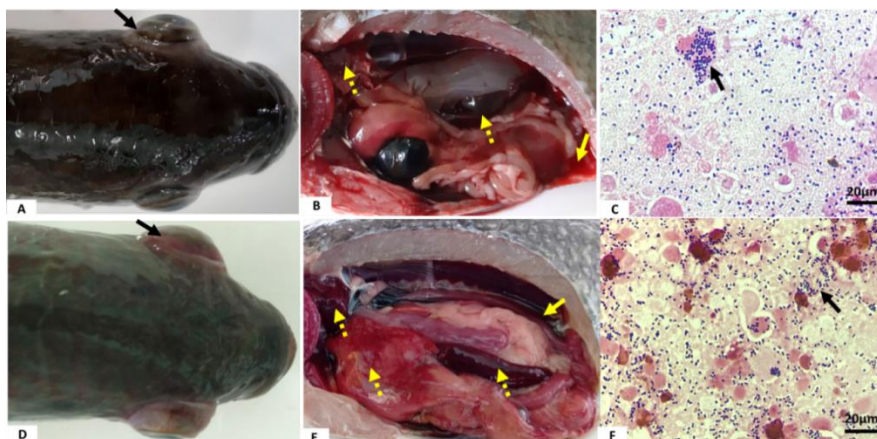
3.4. Đặc điểm bệnh lý của cá cảm nhiễm

So sánh các đặc điểm bệnh lý của cá nhiễm bệnh sau cảm nhiễm cho thấy ngoại trừ hiện tượng chết nhanh ở các lô gây nhiễm chủng serotype III so với serotype Ia, không có sự khác biệt đáng kể nào về triệu chứng và bệnh tích của cá khi được cảm nhiễm ở cùng các nồng độ vi khuẩn giữa hai serotype trên. Ở những lô cá nhiễm bệnh nặng, cá đều có mất lồi, đục và xuất huyết rất rõ, các cơ quan nội tạng xuất huyết nặng, gan, thận, lách sưng, tích nhiều dịch trong xoang bụng (Hình 7). Mô thận, lách, não, gan đều có sự xâm nhập liên cầu khuẩn với mật độ cao.

Để so sánh biến đổi mô bệnh học trên cá nhiễm serotype III hoặc serotype Ia, bộ tiêu bản mô bệnh của cá được cảm nhiễm ở cùng nồng độ tiêu 10^5 CFU/cá được sử dụng để đánh giá và so sánh biến đổi mô bệnh học của cá cảm nhiễm bởi hai serotype này do ở nồng độ tiêu này hầu hết cá nhiễm bệnh đều có triệu chứng, bệnh tích đặc trưng của bệnh. Kết quả cũng được so sánh với biểu hiện mô ở cá khỏe mạnh thu từ lô đối chứng tiêu PBS (Hình 7). Kết quả phân tích mô học cho thấy các mẫu mô đều có đặc điểm mô bệnh đặc trưng nhất là xuất hiện khối viêm lan

toả, trung tế bào gây viêm và xâm nhiễm vi khuẩn, kèm theo hiện tượng tụ huyết và xuất huyết ở nhiều hệ cơ quan. Nhìn chung, không có sự khác biệt về mức độ tổn thương mô học ở các hệ cơ quan khi cảm nhiễm bằng hai chủng khuẩn *S. agalactiae* serotype Ia hoặc III (Hình 8).

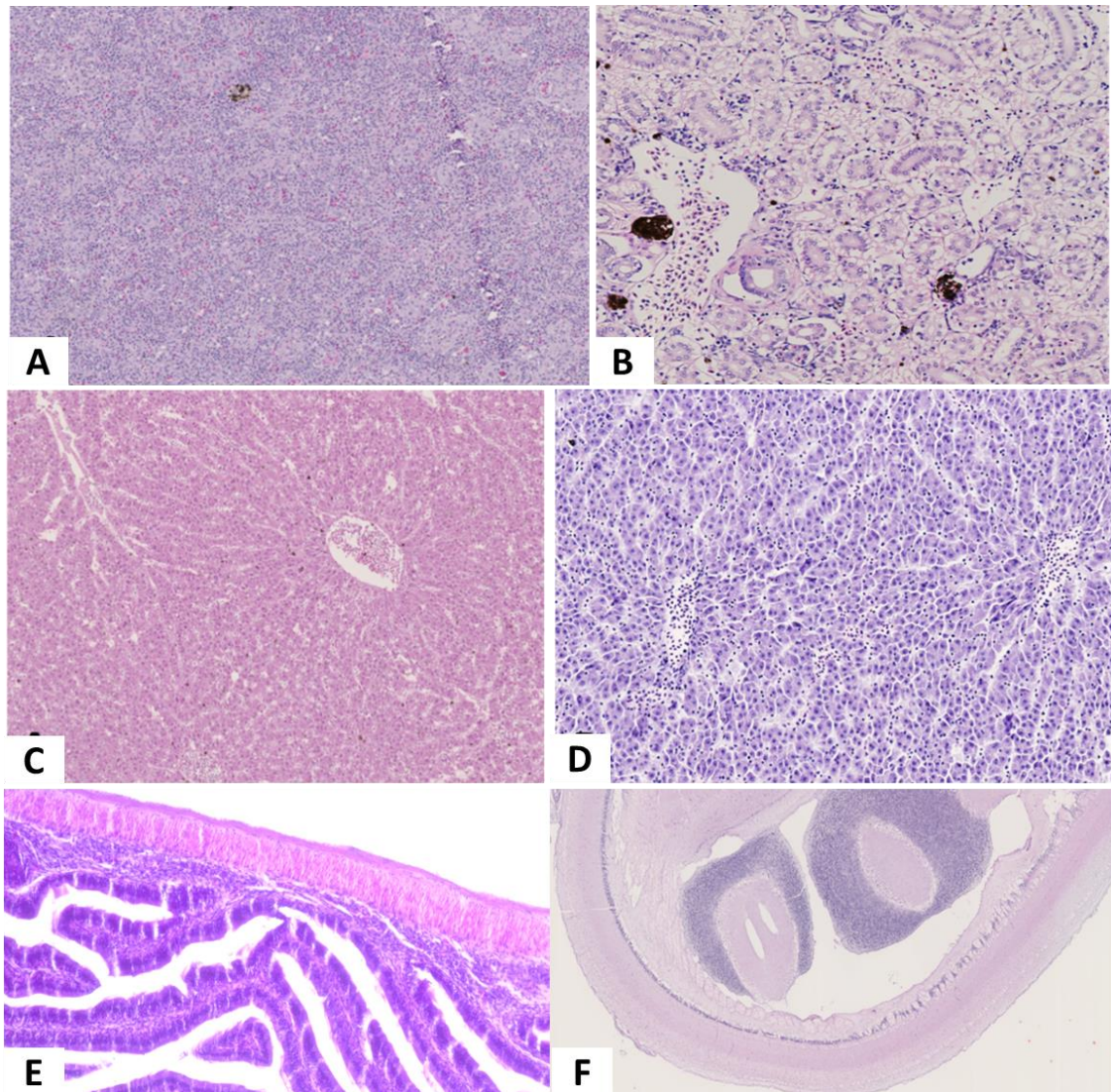
Lách cá bệnh có hiện tượng tụ huyết trong mạch máu, xuất hiện trung tâm đại thực bào sắc tố, tập trung bạch cầu chứa vi khuẩn và các dạng tế bào gây viêm khác gần vùng hoại tử, xuất huyết, vùng rìa khối lách tập trung vật chất dạng sợi, các sản phẩm từ quá trình hoại tử tế bào (Hình 9A, B). Thận cá nhiễm bệnh có dấu hiệu xuất huyết, tụ huyết, thoái hóa và mất cấu trúc ống thận, viêm cầu thận, viêm tế bào kẽ, tập trung tế bào gây viêm, bạch cầu đơn nhân chứa vi khuẩn xung quanh vùng xuất huyết, hoại tử (Hình 9C, D). Gan cá nhiễm bệnh có hiện tượng tụ huyết, xuất huyết, một số vùng gan bị thoái hóa, mất cấu trúc tế bào, tập trung bạch cầu đơn nhân và vi khuẩn ở vùng xuất huyết, hoại tử. Mô gan cũng có những vùng bị thoái hoá mô (Hình 9E-H). Cá nhiễm *S. agalactiae* có thành ruột mỏng, xuất huyết, kèm theo các khối viêm, một số vùng lớp biểu bì tách ra khỏi các lớp tế bào ruột (Hình 9I, K). Hiện tượng xuất huyết và tụ huyết não cũng đều quan sát được trên cá nhiễm serotype Ia và III (Hình 9L, M). Như vậy, về cơ bản biến đổi mô học của cá cảm nhiễm serotype ST Ia và ST III có sự tương đồng cao.



Ghi chú: A, D: Cá nhiễm bệnh có mất lồi, xuất huyết (mũi tên); B, E: Bụng nhiều dịch (mũi tên liền), nội quan sưng, xuất huyết (mũi tên đứt); C, F: Liên cầu khuẩn tập trung nhiều trong mô thận cá (mũi tên).

Hình 7. Triệu chứng, bệnh tích và sự xâm nhiễm vi khuẩn trong mô lách cá cảm nhiễm bằng chủng ST Ia (A-C) và chủng ST III (D-F)

Đánh giá khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* serotype Ia và III trên cá rô phi trong điều kiện thực nghiệm



Ghi chú: A: Mô lách; B: Mô thận; C, D: Mô gan; E: Mô ruột; F: Mô não; độ phóng đại x40.

Hình 8. Biểu hiện trên mô cá rô phi ở lô đối chứng tiêm PBS

Trong nghiên cứu, đặc trưng biến đổi mô bệnh ở cá cảm nhiễm bệnh tương đồng với các đặc điểm mô bệnh học của cá rô phi nhiễm *S. agalactiae* được báo cáo trước đây (Asencios & cs., 2016, Trương Đình Hoài & cs., 2014). Vi khuẩn *S. agalactiae* được biết đến với khả năng sống sót và nhân lên trong đại thực bào cá rô phi từ đó hạn chế được các tác động của hệ miễn dịch (Cao & cs., 2022; Wang cs., 2017). Đại thực bào mang vi khuẩn được coi là vật mang mầm bệnh trong hệ tuần hoàn đến các cơ quan trong cơ thể cá, vượt qua được rào cản của hệ miễn dịch để xâm nhập và gây bệnh ở não cá, gây ra các triệu chứng ở hệ thần kinh như bơi xoáy ốc

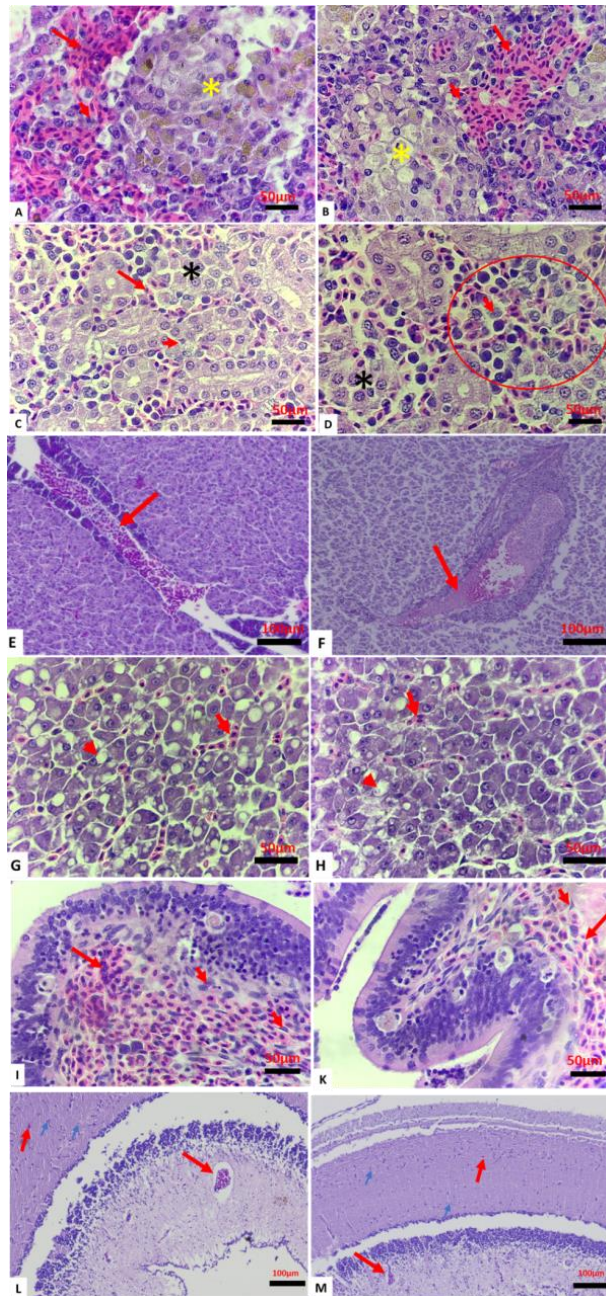
và viêm màng não (Cao & cs., 2022; Zlotkin & cs., 2003). Vi khuẩn bám và nhân lên ở mô liên kết các hệ cơ quan gây thoái hóa, nếu nặng có thể gây ra hoại tử các mô bào (Cao & cs., 2022; Soto & cs., 2015).

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu này cho thấy sơ bộ *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi một số trại nuôi miền Bắc đang lưu hành ít nhất hai serotype là ST Ia và ST III. Ngoài đặc điểm gây chết nhanh và sớm hơn trên cá thí nghiệm của chủng ST III, không có sự khác biệt lớn về độc lực

và khả năng gây bệnh của serotype ST Ia và ST III thông qua đánh giá khả năng gây bệnh, tỉ lệ chết, đặc điểm lâm sàng, bệnh tích vi thể và đại

thể. Nghiên cứu này bước đầu đánh giá độc lực và khả năng gây bệnh của *S. agalactiae* thuộc hai serotype Ia và III trong điều kiện thí nghiệm.



Ghi chú: A, B: Lách cá có bị xuất huyết lách (mũi tên dài), tập trung tế bào bạch cầu, đại thực bào mang vi khuẩn, (mũi tên ngắn), trung tâm đại thực bào (* vàng); C, D: Thận cá bị xuất huyết (mũi tên dài), nhiều vùng viêm tập trung đại thực bào, tế bào gây viêm và vi khuẩn (mũi tên ngắn, hình ovan), một số ống thận bị thoái hóa (*); E, F: Gan cá bị xuất huyết, tụ huyết (mũi tên dài); G, H: Xuất huyết gan (mũi tên ngắn), thoái hóa mỡ (đầu mũi tên); I, K: Ruột xuất huyết (mũi tên dài), tập trung tế bào gây viêm (mũi tên ngắn); L, M: Não xung huyết và xuất huyết (mũi tên đỏ) và sự hiện diện của nhiều cầu khuẩn (mũi tên xanh).

Hình 9. Biến đổi mô bệnh trên cá cảm nhiễm chủng vi khuẩn ST Ia (A, C, E, G, I, L) và chủng ST III (B, D, F, H, K, M) ở nồng độ 10^5 CFU/cá

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.05-2020.18. Các tác giả xin chân thành cảm ơn các trang trại nuôi cá rô phi và sinh viên Khoa thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam tạo điều kiện và hỗ trợ để hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baya A., Lupiani B., Hetrick F., Roberson B., Lukacovic R., May E. & Poukish C. (1990). Association of *Streptococcus* sp. with fish mortalities in the Chesapeake Bay and its tributaries. *Journal of Fish Diseases*. 13(3): 251-253.
- Cao J., Liu Z., Zhang D., Guo F., Gao F., Wang M., Yi M. & Lu M. (2022). Distribution and localization of *Streptococcus agalactiae* in different tissues of artificially infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 546: 737370.
- Chen M., Wang R., Luo F.-G., Huang Y., Liang W.-W., Huang T., Lei A.-Y., Gan X. & Li L.-P. (2015). *Streptococcus agalactiae* isolates of serotypes Ia, III and V from human and cow are able to infect tilapia. *Veterinary Microbiology*. 180(1-2): 129-135.
- Đặng Thị Hoàng Oanh & Nguyễn Thanh Phương (2012). Phân lập và xác định đặc điểm của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* từ cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.) gây bệnh mù mắt và xuất huyết. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. tr. 203-212.
- Delannoy C.M., Samai H. & Labrie L. (2021). *Streptococcus agalactiae* serotype IV in farmed tilapia. *Aquaculture*. p. 737033.
- Evans J.J., Bohnsack J.F., Klesius P.H., Whiting A.A., Garcia J.C., Shoemaker C.A. & Takahashi S. (2008). Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan. *Journal of medical microbiology*. 57(11): 1369-1376.
- Gagnon M., Hunting W. & Esselen W. (1959). New method for catalase determination. *Analytical Chemistry*. 31(1): 144-146.
- Godoy D., Carvalho-Castro G., Leal C., Pereira U., Leite R. & Figueiredo H. (2013). Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*. *Letters in Applied Microbiology*. 57(6): 476-483.
- Hugh R. & Leifson E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of bacteriology*. 66(1): 24-26.
- Imperi M., Pataracchia M., Alfarone G., Baldassarri L., Orefici G. & Creti R. (2010). A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. *Journal of microbiological methods*. 80(2): 212-214.
- Kannika K., Pisuttharachai D., Srisapoom P., Wongtavatchai J., Kondo H., Hirono I., Unajak S. & Areechon N. (2017). Molecular serotyping, virulence gene profiling and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia farms in Thailand by multiplex PCR. *Journal of applied microbiology*. 122(6): 1497-1507.
- Kayansamruaj P., Soontara C., Unajak S., Dong H.T., Rodkhum C., Kondo H., Hirono I. & Areechon N. (2019). Comparative genomics inferred two distinct populations of piscine pathogenic *Streptococcus agalactiae*, serotype Ia ST7 and serotype III ST283, in Thailand and Vietnam. *Genomics*. 111(6): 1657-1667.
- Kim B.J., Hancock B.M., Del Cid N., Bermudez A., Traver D. & Doran K.S. (2015). *Streptococcus agalactiae* infection in zebrafish larvae. *Microbial Pathogenesis*. 79: 57-60.
- Li J., Ye X., Lu M., Deng G., Tian Y., Jiang X. & Li J. (2010). Rapid identification of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* with duplex PCR assay. *Journal of Hunan Agricultural University*. 36(4): 449-452.
- Li L., Wang R., Liang W., Gan X., Huang T., Huang Y., Li J., Shi Y., Chen M. & Luo H. (2013). Rare serotype occurrence and PFGE genotypic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in China. *Veterinary Microbiology*. 167(3-4): 719-724.
- Li Y., Liu L., Huang P., Fang W., Luo Z., Peng H., Wang Y. & Li A. (2014). Chronic streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): caused by *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Fish Diseases*. 37(8): 757-763.
- Mian G., Godoy D., Leal C., Yuhara T., Costa G. & Figueiredo H. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*. 136(1-2): 180-183.
- Morrison J., Smith C., Heidel J., Mumford S., Blazer V. & MacConnell E. (2007). *Fish Histology and Histopathology Manual*. National Conservation Training Center. West Virginia.
- Najiah M., Aqilah N., Lee K., Khairulbariyyah Z., Mithun S., Jalal K., Shaharom-Harrison F. & Nadirah M. (2012). Massive mortality associated

- with *Streptococcus agalactiae* infection in cage-cultured red hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* in Como River, Kenyir Lake, Malaysia. *Journal of Biological Sciences*. 12(8): 438-442.
- Nguyễn Ngọc Phước, Trần Thị Nhật Anh & Nguyễn Thị Huế Linh (2019). 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. *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Nông nghiệp-Trường Đại học Huế*. 3(3): 1591-1601.
- Poyart C., Tazi A., Réglie-Poupet H., Billoët A., Tavares N., Raymond J. & Trieu-Cuot P. (2007). Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group B streptococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(6): 1985-1988.
- Rosinski-Chupin I., Sauvage E., Mairey B., Mangenot S., Ma L., Da Cunha V., Rusniok C., Bouchier C., Barbe V. & Glaser P. (2013). Reductive evolution in *Streptococcus agalactiae* and the emergence of a host adapted lineage. *BMC genomics*. 14(1): 1-15
- Sirimanapong W., Phước N.N., Crestani C., Chen S. & Zadoks R.N. (2023). Geographical, Temporal and Host-Species Distribution of Potentially Human-Pathogenic Group B Streptococcus in Aquaculture Species in Southeast Asia. *Pathogens*. 12(4): 525.
- Soto E., Wang R., Wiles J., Baumgartner W., Green C., Plumb J. & Hawke J. (2015). Characterization of isolates of *Streptococcus agalactiae* from diseased farmed and wild marine fish from the US Gulf Coast, Latin America, and Thailand. *Journal of aquatic animal health*. 27(2): 123-134.
- Suanyuk N., Kong F., Ko D., Gilbert G.L. & Supamattaya K. (2008). Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand - relationship to human isolates? *Aquaculture*. 284(1-4): 35-40.
- Suwannasang A., Dangwetngam M., Issaro A., Phromkunthong W. & Suanyuk N. (2014). Pathological manifestations and immune responses of serotypes Ia and III *Streptococcus agalactiae* infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 36(5): 499-506.
- Syuhada R., Zamri-Saad M., Ina-Salwany M., Mustafa M., Nasruddin N., Desa M., Nordin S., Barkham T. & Amal M. (2020). Molecular characterization and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* serotypes Ia ST7 and III ST283 isolated from cultured red hybrid tilapia in Malaysia. *Aquaculture*. 515: 734543.
- Trương Đình Hoàì, Nguyễn Vũ Sơn, Nguyễn Thị Hoàì, Nguyễn Thị Mai Phương & Nguyễn Thị Hậu (2014). Đặc điểm mô bệnh học của cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) nhiễm *Streptococcus* sp. nuôi tại một số tỉnh miền bắc Việt Nam. *J. Sci*. 12(3): 360-371.
- Wang J., Wu J., Yi L., Hou Z. & Li W. (2017). Pathological analysis, detection of antigens, FasL expression analysis and leucocytes survival analysis in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after infection with green fluorescent protein labeled *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology*. 62: 86-95.
- Yanong R.P. & Francis-Floyd R. (2002). Streptococcal infections of fish. Florida Cooperative Extension Service. IFAS, University of Florida. pp. 1-5.
- Zhang D., Li A., Guo Y., Zhang Q., Chen X. & Gong X. (2013). Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* in diseased farmed tilapia in China. *Aquaculture*. 412: 64-69.
- Zhang X., Fan H., Zhong Q., Zhuo Y.-c., Lin Y. & Zeng Z. (2008). Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* from tilapia. *Journal of Fisheries of China*. 5: 772-779.
- Zhang Z. (2021). Research Advances on *Tilapia Streptococcosis*. *Pathogens*. 10(5): 558.
- Zhang Z., Lan J., Li Y., Hu M., Yu A., Zhang J. & Wei S. (2018). The pathogenic and antimicrobial characteristics of an emerging *Streptococcus agalactiae* serotype IX in Tilapia. *Microbial Pathogenesis*. 122: 39-45.
- Zlotkin A., Chilmonczyk S., Eyngor M., Hurvitz A., Ghitino C. & Eldar A. (2003). Trojan horse effect: phagocyte-mediated *Streptococcus iniae* infection of fish. *Infection and immunity*. 71(5): 2318-2322.