

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP HÀ NỘI**

PHẠM HỒNG QUÂN

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VI KHUẨN
STREPTOCOCCUS SPP. GÂY BỆNH XUẤT HUYẾT Ở CÁ RÔ PHI
NUÔI TẠI MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM**

LUẬN VĂN THẠC SĨ

HÀ NỘI – 2013

**BỘ GIAO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP HÀ NỘI**

PHẠM HỒNG QUÂN

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VI KHUẨN
STREPTOCOCCUS SPP. GÂY BỆNH XUẤT HUYẾT Ở CÁ RÔ PHI
NUÔI TẠI MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM**

**Chuyên ngành: CÔNG NGHỆ SINH HỌC
Mã số: 06.42.02.01**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:
TS. LÊ VĂN KHOA
TS. HUỖNH THỊ MỸ LỆ**

HÀ NỘI - 2013

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả được nêu trong luận văn là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác. Đồng thời tất cả các thông tin tôi trích dẫn trong luận văn đều đã được chỉ rõ nguồn gốc.

Tác giả

Phạm Hồng Quân

LỜI CẢM ƠN !

Để hoàn thành các nội dung cơ bản trong luận văn tốt nghiệp này, ngoài sự nỗ lực và cố gắng của bản thân tôi còn nhận được sự giúp đỡ không nhỏ của nhiều tổ chức, cơ quan và các cá nhân.

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới TS. Lê Văn Khoa – Cục Thú Y, TS. Huỳnh Thị Mỹ Lệ - Đại học Nông nghiệp Hà Nội là những người định hướng và trực tiếp hướng dẫn tôi hoàn thành luận văn.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới TS. Nguyễn Hữu Vũ, ThS. Hồ Thu Thủy cùng các anh chị Trung tâm nghiên cứu – Công ty Hanvet đã tạo mọi điều kiện tốt nhất để tôi thực hiện đề tài.

Tôi xin được bày tỏ lòng kính trọng, biết ơn chân thành tới các thầy cô giáo trong trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, trong suốt hai năm học tại trường, tôi đã nhận được sự dạy dỗ, dìu dắt tận tình của các thầy cô giáo trong trường.

Nhân đây, tôi xin gửi lời cảm ơn tới tất cả bạn bè, các bạn đồng nghiệp những người đã góp ý chân thành, giúp đỡ và động viên tôi trong suốt thời gian tôi hoàn thành luận văn này.

Cuối cùng, con xin cảm ơn bố mẹ, các anh chị em đã luôn cổ vũ, động viên con trong những lúc khó khăn nhất giúp con có thêm nghị lực để có được ngày hôm nay.

Tác giả

Phạm Hồng Quân

MỤC LỤC

Lời cam đoan	i
Lời cảm ơn !	ii
Mục lục	iii
Danh mục chữ viết tắt	vi
Danh mục bảng	vii
Danh mục hình	viii
1 MỞ ĐẦU	1
1.1 Đặt vấn đề	1
1.2 Mục đích của đề tài:	3
1.3 Ý nghĩa khoa học của đề tài	3
1.4 Ý nghĩa thực tiễn của đề tài	3
2 TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
2.1 Một số đặc điểm sinh học của cá rô phi	4
2.1.1 Nguồn gốc	4
2.1.2 Phân loại	4
2.1.3 Đặc điểm môi trường sống và tập tính dinh dưỡng	5
2.2 Tình hình nuôi cá rô phi	6
2.2.1 Tình hình nuôi cá rô phi trên thế giới	6
2.2.2 Tình hình nuôi cá rô phi tại Việt Nam	6
2.3 Tình hình nghiên cứu dịch bệnh ở cá rô phi	7
2.3.1 Tình hình nghiên cứu dịch bệnh ở cá rô phi trên thế giới	7
2.3.2 Tình hình nghiên cứu dịch bệnh cá rô phi ở trong nước	10
2.4 Tình hình sử dụng thuốc trong nuôi trồng thủy sản	15
3 NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
3.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu	17
3.1.1 Thời gian nghiên cứu	17
3.1.2 Địa điểm nghiên cứu	17

3.2	Nội dung nghiên cứu	17
3.3	Vật liệu nghiên cứu	17
3.3.1	Dụng cụ, thiết bị phục vụ nghiên cứu	17
3.3.2	Môi trường, hóa chất phục vụ nghiên cứu	18
3.3.3	Vật liệu nghiên cứu	18
3.4	Phương pháp nghiên cứu	19
3.4.1	Phương pháp thu mẫu cá bệnh	19
3.4.2	Phương pháp mổ cá để lấy nội tạng	19
3.4.3	Phương pháp phân lập vi khuẩn <i>Streptococcus</i> spp. có trong mẫu bệnh phẩm	20
3.4.4	Phương pháp đếm mật độ vi khuẩn	21
3.4.5	Phương pháp định danh vi khuẩn <i>Streptococcus</i> spp.	21
3.4.6	Phương pháp xác định độc lực của các chủng vi khuẩn <i>Streptococcus</i> spp.	26
3.4.7	Phương pháp xác định tính kháng nguyên	29
3.4.8	Phương pháp kiểm tra khả năng miễn cảm với kháng sinh của vi khuẩn	32
3.4.9	Phương pháp xử lý số liệu	33
4	KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	34
4.1	Kết quả phân lập vi khuẩn <i>Streptococcus</i> spp	34
4.1.1	Kết quả thu mẫu	34
4.1.2	Kết quả phân lập vi khuẩn	35
4.2	Kết quả xác định một số đặc tính sinh hóa của vi khuẩn <i>Streptococcus</i> spp. phân lập được.	37
4.2.1	Kết quả xác định một số đặc tính sinh học	37
4.2.2	Kết quả định danh vi khuẩn	38
4.3	Kết quả xác định độc lực của các chủng vi khuẩn <i>Streptococcus agalactiae</i> phân lập được	40
4.3.1	Kết quả gây bệnh thực nghiệm của vi khuẩn <i>Streptococcus agalactiae</i> ở cá rô phi	40
4.3.2	Kết quả tăng cường độc lực của các chủng vi khuẩn <i>Streptococcus agalactiae</i>	44

4.4	Kết quả xác định tính kháng nguyên của vi khuẩn <i>Streptococcus agalactiae</i> phân lập được	46
4.4.4	Kết quả tạo kháng nguyên cho từng chủng vi khuẩn:	46
4.4.2	Kết quả tạo kháng thể kháng <i>S.agalactiae</i> trên cá rô phi	46
4.4.3	Kết quả phản ứng ngưng kết	47
4.5	Kết quả kiểm tra khả năng miễn cảm với kháng sinh của vi khuẩn <i>Streptococcus agalactiae</i> phân lập được	49
5	KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	51
5.1	Kết luận	51
5.2	Đề nghị	51
	TÀI LIỆU THAM KHẢO	52
	PHỤ LỤC	55
	BÀI BÁO KHOA HỌC	73

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Ctv: Cộng tác viên

KS: Kháng sinh

VK: Vi khuẩn

DANH MỤC BẢNG

STT	Tên bảng	Trang
2.1	Vi khuẩn gây bệnh trên cá rô phi nuôi tại khu vực Đông Nam Á (Lauke Labrie, 2007)	10
3.1	Thuốc thử và cách đọc kết quả các phản ứng sinh hóa trong API 20 Strep	25
3.2	Bố trí thí nghiệm xác định độc lực vi khuẩn gây bệnh xuất huyết ở cá rô phi	27
3.3	Đánh giá đường kính vòng vô khuẩn chuẩn	33
4.1	Kết quả thu mẫu cá nghi bị bệnh xuất huyết	35
4.2	Thành phần loài vi khuẩn phân lập được từ mẫu cá bệnh	36
4.3	Kết quả phân lập vi khuẩn <i>Streptococcus</i> spp. từ các cơ quan của cá rô phi	37
4.4	Kết quả giám định và định danh vi khuẩn <i>Streptococcus</i> spp.	39
4.5	Kết quả gây bệnh thực nghiệm của các chủng vi khuẩn <i>Streptococcus agalactiae</i> thu tại Hải Dương	41
4.6	Kết quả gây bệnh thực nghiệm của các chủng vi khuẩn <i>Streptococcus agalactiae</i> thu tại Hà Nội	42
4.7	Kết quả gây bệnh thực nghiệm của các chủng vi khuẩn <i>Streptococcus agalactiae</i> thu tại Hải Phòng	42
4.8	Kết quả gây bệnh thực nghiệm của các chủng vi khuẩn <i>Streptococcus agalactiae</i> thu tại Quảng Ninh	43
4.9	Bảng kết quả tăng cường độc lực các chủng vi khuẩn <i>S.agalactiae</i>	45
4.10	Kết quả kiểm tra phản ứng ngưng kết với kháng thể pha loãng	48
4.11	Kết quả thử kháng sinh đồ của 52 chủng <i>S.agalactiae</i> với 10 loại thuốc kháng sinh thường dùng	49

DANH MỤC HÌNH

STT	Tên hình	Trang
2.1	Cá rô phi vằn (<i>Oreochromis niloticus</i>)	4
2.2	Cá rô phi đỏ (cá điêu hồng)	5
2.3	Tác nhân gây bệnh trên cá rô phi ở các giai đoạn nuôi	10
3.1	Cách mổ xoang bụng cá	20
3.2	Cách mổ não cá	20
3.3	Sơ đồ nuôi cấy, phân lập vi khuẩn <i>Streptococcus</i> spp.	21
3.4	Sơ đồ bố trí thí nghiệm gây bệnh cho cá rô phi	28
3.5	Cá rô phi thí nghiệm	30
4.1	Dấu hiệu bệnh lý của cá lúc thu mẫu. A: Mắt cá bị lồi, đục. B: Nội tạng cá bị xuất huyết. C: Cá bơi lờ đờ, hoạt động chậm chạp. D: Bụng cá trương to và xuất huyết	34
4.2	Hình thái khuẩn lạc <i>Streptococcus</i> spp. khi nuôi cấy trên môi trường thạch máu	38
4.3	Vi khuẩn <i>Streptococcus</i> spp.	38
4.4	Hình thái khuẩn lạc <i>Streptococcus</i> spp. khi nuôi cấy trên môi trường BHIA	38
4.5	Kết quả thử kit API 20Strep định danh <i>Streptococcus agalactiae</i>	38
4.6	Cá rô phi có dấu hiệu bệnh lý sau 24 giờ gây nhiễm với vi khuẩn <i>Streptococcus agalactiae</i>	44
4.7	Vi khuẩn bất hoạt bằng formalin trước ly tâm (A); sau ly tâm (B); pha với nước muối sinh lý (C)	46
4.8	Hình ảnh thu huyết thanh cá (A): Máu cá; (B): Máu cá sau khi giữ lạnh và ly tâm	47
4.9	Kết quả phản ứng ngưng kết nhanh trên phiến kính	47
4.10	Hiện tượng ngưng kết quan sát bằng kính hiển vi (40X)	48
4.11	Kiểm tra khả năng miễn cảm với kháng sinh	50

1. MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Những năm gần đây, nghề nuôi trồng thủy sản (NTTS) đã không ngừng phát triển và ngày càng chiếm vị trí quan trọng trong ngành Thủy sản nói riêng và kinh tế đất nước nói chung. Với kim ngạch xuất khẩu năm 2010 đạt 4,94 tỷ USD thì đây là một trong ba ngành có đóng góp lớn nhất cho tổng kim ngạch xuất khẩu của Việt Nam. Tổng cục Thủy sản (Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn) cho biết, giai đoạn 2011 – 2015 ngành Thủy sản hướng đến sự phát triển bền vững, là một ngành xuất khẩu hàng hóa lớn, có khả năng cạnh tranh cao và hội nhập vững chắc với thế giới. Mục tiêu quan trọng hàng đầu là đẩy mạnh xuất khẩu đạt kim ngạch 6,5 tỷ USD vào năm 2015 và chiếm khoảng 37% trong khối nông lâm ngư nghiệp. Vì vậy việc quản lý dịch bệnh trên các đối tượng chủ lực là yếu tố quan trọng để đạt được mục tiêu trên. Tuy nhiên hiện tại nghề NTTS tại Việt Nam đang gặp phải những trở ngại lớn như dịch bệnh BNP trên cá tra cá basa, dịch bệnh xuất huyết trên cá rô phi, bệnh đốm đỏ trên cá trắm cỏ, bệnh đốm trắng trên tôm sú, bệnh virus trên cá chép.... Để quản lý các dịch bệnh trên các đối tượng quan trọng, nhiều giải pháp đã được đặt ra như: lựa chọn các con giống sạch bệnh, quản lý tốt môi trường, dinh dưỡng, sử dụng thuốc và hóa chất, tuy nhiên chưa mang lại hiệu quả cao. Vì vậy việc phát triển và ứng dụng các chế phẩm sinh học, đặc biệt là vacxin trong NTTS có ý nghĩa cấp thiết trong việc quản lý dịch bệnh đạt hiệu quả cao hơn.

Bên cạnh sự phát triển nhanh chóng của nghề nuôi ven biển và nghề nuôi biển thì nghề nuôi cá nước ngọt vẫn khẳng định được vai trò của mình. Trong đó, đối tượng cá rô phi với những ưu điểm như cá ít bị sốc với biến đổi của môi trường và có khả năng kháng được một số bệnh, thức ăn không đòi hỏi chất lượng quá cao, giá thành sản xuất thấp nên các quốc gia đang phát triển đặc biệt chú trọng đến phát triển nuôi loài cá này. Tuy nhiên, khi phát triển nuôi cá rô phi với mật độ cao và nuôi thâm canh thì cũng phát hiện một số bệnh ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng thực phẩm. Qua nghiên cứu, người ta đã chỉ ra rằng bệnh ở cá rô phi chủ yếu

là do vi khuẩn, virút, nấm, và ký sinh trùng (Shoemaker, 2008). Đặc biệt là bệnh do do vi khuẩn *Streptococcus* spp. (liên cầu khuẩn) gây ra là nguyên nhân gây nên thiệt hại lớn cho cá rô phi nói riêng và cá nước ngọt nói chung, làm ảnh hưởng đến hiệu quả kinh tế của ngành nuôi trồng thủy sản. Theo thống kê thì liên cầu khuẩn gây bệnh trên cá chủ yếu là hai loài *Streptococcus iniae* và *Streptococcus agalactiae*.

Hiện nay, việc phòng trị bệnh trên cá nước ngọt ở nước ta vẫn chủ yếu dựa vào việc sử dụng thuốc kháng sinh và hóa chất. Hiện tại chỉ có một loại vắc-xin bảo vệ cá tra chống lại vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. Vắc-xin ALPHA JECT® Panga 1 được Cục Thú y (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn) vừa công bố cấp phép tiếp thị kể từ ngày 10/4/2013. Trong khi đó trên thế giới đã có 36 loại vắc-xin phòng bệnh do vi khuẩn gây ra và hai loại vắc-xin phòng bệnh do virut. Việc phòng trị bệnh chủ yếu phụ thuộc vào các loại thuốc kháng sinh và hóa chất gần đây đã khiến cho việc xuất khẩu thủy sản của Việt Nam gặp rất nhiều khó khăn do danh mục các loại thuốc và hóa chất cấm sử dụng trong nuôi trồng thủy sản ngày càng tăng. Ví dụ cụ thể đó là việc cấm sử dụng chloramphenicol, flomequine và xanh malachite đã ảnh hưởng lớn cho nghề xuất khẩu cá Tra và cá Ba Sa của Việt Nam trong năm 2005 và 2006. Mỹ là thị trường lớn nhất cho cá da trơn của Việt Nam trước năm 2005 đã có những chính sách tăng thuế nhập khẩu cá tra và cá Ba Sa vào nước này. Bên cạnh chính sách bảo hộ nghề nuôi cá da trơn nội địa của chính phủ Mỹ thì việc sử dụng thuốc thuộc danh mục cấm là một trong những nguyên nhân dẫn đến việc khó khăn tìm thị trường đầu ra cho các sản phẩm của hai đối tượng trên. Vì vậy việc nghiên cứu, phát triển các phương pháp phòng trị bệnh có hiệu quả như sử dụng các loại thảo dược, chất tách chiết từ thảo dược và vắc-xin cho cá nước ngọt là rất cần thiết nhằm đảm bảo cho sự phát triển bền vững của nghề. Sử dụng vắc-xin phòng bệnh cho cá giúp giảm tỷ lệ chết, giảm việc sử dụng các loại kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản và hạ giá thành sản phẩm. Bên cạnh đó việc sử dụng vắc-xin cũng góp phần vào việc tạo ra các sản phẩm đạt tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm. Hiện nay chưa có bất kỳ loại vắc-xin phòng bệnh *Streptococcosis* gây bệnh trên cá rô phi được nghiên cứu và ứng dụng vào sản xuất tại Việt Nam. Vì vậy, việc phân lập và xác định đặc tính sinh học của *Streptococcus* spp. là cần thiết, là cơ sở khoa học để

giúp cho việc nghiên cứu và sản xuất vacxin phòng bệnh do vi khuẩn *Streptococcus* spp. ở cá rô phi nuôi tại Việt Nam.

Với mục tiêu như vậy, tôi tiến hành thực hiện đề tài: "***Nghiên cứu một số đặc tính sinh học của vi khuẩn Streptococcus spp. gây bệnh xuất huyết ở cá rô phi nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam***" nhằm cung cấp nguồn giống vi khuẩn để tiến hành nghiên cứu chế tạo kit và vacxin phục vụ cho chẩn đoán nhanh và phòng, trị bệnh.

1.2. Mục đích của đề tài:

Phân lập và xác định được một số đặc tính sinh học của vi khuẩn *Streptococcus* spp. phục vụ cho nghiên cứu kit chẩn đoán và vacxin phòng bệnh xuất huyết trên cá rô phi tại một số tỉnh miền Bắc.

1.3. Ý nghĩa khoa học của đề tài

Phân lập và xác định được một số đặc tính sinh học của vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây bệnh xuất huyết ở cá rô phi tại một số tỉnh miền Bắc.

Xác định tính kháng nguyên của chủng vi khuẩn đã lựa chọn.

Xác định khả năng miễn cảm, kháng kháng sinh của vi khuẩn đã lựa chọn.

1.4. Ý nghĩa thực tiễn của đề tài

Nghiên cứu này nhằm chọn ra những chủng vi khuẩn có kháng nguyên đáp ứng miễn dịch tốt để phục vụ nghiên cứu sản xuất vacxin.

Xác định khả năng miễn cảm, kháng kháng sinh của vi khuẩn đã lựa chọn từ đó có cơ sở khoa học lựa chọn kháng sinh có tính miễn cảm cao với loại vi khuẩn trên để điều trị bệnh *Streptococcosis*.

Phục vụ cho chiến lược phòng trị bệnh trên cá rô phi nhằm tìm ra phương pháp sản xuất vacxin hiệu quả cao, chi phí sử dụng vacxin thấp và dễ áp dụng ở điều kiện của Việt Nam.

Giúp người nuôi trồng thủy sản đưa ra biện pháp phòng và chọn thuốc điều trị theo đúng nguyên tắc sử dụng kháng sinh tránh gây ra các dòng vi khuẩn kháng thuốc gây ô nhiễm môi trường và hạn chế được tồn dư kháng sinh trong cá rô phi, đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm cho người tiêu dùng.

2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Một số đặc điểm sinh học của cá rô phi

2.1.1. Nguồn gốc

Cá rô phi có nguồn gốc từ Châu Phi, cá được nuôi đầu tiên ở Kenya và sau đó nuôi rộng rãi nhiều nước ở Châu Phi và trên thế giới. Cá được nuôi nhiều nhất là ở những nước nhiệt đới và cận nhiệt đới. Rô phi đen (*Oreochromis mossambicus*) là loài cá rô phi đầu tiên được nhập vào nước ta năm 1951. Rô phi vằn (*O. niloticus*) được nhập từ Đài Loan năm 1973, sau đó cá rô phi được cải thiện chất lượng di truyền (dòng GIFT) đã được giới thiệu vào Việt Nam từ Thái Lan năm 1994.

2.1.2. Phân loại

Cá rô phi thuộc lớp: Osteichthyes; Lớp phụ: Actynopteriigi.

Bộ: Perciformes; Bộ phụ: Perciidae.

Họ: Cichlidae

Giống: *Tilapia*, *Sarotherodon*, *Oreochromis*

Loài: *Tilapia* sp, *Sarotherodon* sp, *Oreochromis* sp

Hiện nay có 2 loài chính được phổ biến tại Việt Nam là :

Cá rô phi vằn (Rô phi Đài Loan, *Oreochromis niloticus*) được nhập vào Việt Nam năm 1973 từ Đài Loan.



Hình 2.1: Cá rô phi vằn
(*Oreochromis niloticus*)

Cá rô phi đỏ (*Oreochromis* sp.), còn được gọi là cá điêu hồng, có màu hồng được nhập vào Việt Nam năm 1985 từ Malaysia.



Hình 2.2: Cá rô phi đỏ (cá điêu hồng)

2.1.3. Đặc điểm môi trường sống và tập tính dinh dưỡng

Rô phi là loài cá có nguồn gốc ở vùng nhiệt đới, nên khả năng thích nghi với nhiệt độ cao tốt hơn nhiệt độ thấp. Nhiệt độ thích hợp cho cá sinh trưởng, phát triển là 25 – 30⁰C. Rô phi là loài cá có nguồn gốc nước ngọt, nhưng chúng có khả năng sống và phát triển trong môi trường nước lợ, mặn có nồng độ muối tới 35⁰/_∞. Khả năng thích ứng với độ mặn của mỗi loài đều khác nhau. Loài *O. niloticus* có ngưỡng muối thấp nhất và loài có ngưỡng muối cao nhất là *T. zillii*, *O. aureus* (Philipart và Ruwet, 1982). Cá rô phi có thể sống trong môi trường nước có hàm lượng oxy hòa tan thấp tới 1mg/l nhưng không thể kéo dài khi hàm lượng oxy dưới 0,7mg/l (Balarin và Haller, 1982). Khả năng chịu Amoniac tới 2,4mg/l. Cá rô phi có khả năng sống trong môi trường nước có biên độ pH rất rộng 5 – 11, nhưng thích hợp nhất là 6,5 – 8,5. Theo Philipart và Ruwet (1982), Rô phi chết ở khoảng dao động của pH = 3,5 hay pH > 12 sau 2 – 3 giờ.

Rô phi là loài cá ăn tạp, khi còn nhỏ cá ăn sinh vật phù du thủy sinh là chủ yếu, 20 ngày tuổi (17 – 18mm) cá chuyển dần sang thức ăn như cá trưởng thành. Cá trưởng thành ăn mùn bã hữu cơ, tảo các loại, ấu trùng, côn trùng, sinh vật đáy, phù du sinh vật, thực vật thượng đẳng loại mềm, phân hữu cơ... Ngoài ra, trong ao nuôi có thể cho thêm thức ăn bổ sung như cám gạo, bột ngô và các phụ phẩm nông nghiệp khác. Đặc biệt cá rô phi có thể sử dụng rất hiệu quả thức ăn công nghiệp và thức ăn tự chế biến (Balarin và Haller, 1982). Đây là một đặc điểm giúp cho việc nuôi cá rô phi thâm canh đạt năng suất cao. Với những đặc điểm ưu việt đó cá rô phi được phân bố và ương nuôi khá rộng rãi trong các vùng miền của nước ta.

2.2. Tình hình nuôi cá rô phi

2.2.1. Tình hình nuôi cá rô phi trên thế giới

Hiện nay cá rô phi là đối tượng được nuôi phổ biến ở nhiều nước trên thế giới, chiếm một vị trí quan trọng chỉ đứng sau nhóm cá chép trong các thủy vực nước ngọt. Nhờ có những đặc tính tốt như phổ thức ăn đa dạng, ít bệnh tật, chất lượng thịt thơm ngon, đầu tư chi phí để hình thành lên sản phẩm thấp...vì thế mà loài này được nuôi phổ biến, diện tích và sản lượng cũng như chất lượng sản phẩm không ngừng tăng lên, đặc biệt trong những năm gần đây. Trong tương lai, cá Rô phi sẽ là sản phẩm thay thế cho các loại thịt cá trắng đang ngày càng cạn kiệt. Đối tượng chiếm ưu thế và được nuôi phổ biến là giống cá Rô phi vằn *O. niloticus*, với tổng sản lượng là 1,001,302 tấn năm 2002, chiếm 84% của tổng sản lượng cá Rô phi (FAO, 2004).

Tại Hội nghị của INFOFISH TILAPIA 2010 về cá Rô phi tổ chức tại Kuala Lumpur, Malaysia cuối tháng 10/2010, thống kê tổng sản lượng cá Rô phi toàn cầu năm 2010 đạt 3,7 triệu tấn. Mặc dù cá Rô phi có nguồn gốc không phải từ châu Á nhưng đây lại là khu vực sản xuất cá Rô phi quan trọng nhất thế giới. Sản lượng cá Rô phi ở châu Á trong thời gian qua được coi là tăng nhanh nhất thế giới. Các nước châu Á đại diện có nghề nuôi cá Rô phi phát triển mạnh đó là Trung Quốc, Indonesia, Thái Lan, Đài Loan... Tổng sản lượng cả năm nước này chiếm 94% tổng sản lượng cá Rô phi của châu Á. Trong đó Trung Quốc là quốc gia sản xuất cá Rô phi lớn nhất. Tính đến năm 2011, sản lượng cá Rô phi của nước này giữ ổn định ở mức 1,1 – 1,2 triệu tấn và dự kiến vẫn tiếp tục tăng vào các năm tới.

2.2.2. Tình hình nuôi cá rô phi tại Việt Nam

Nghề nuôi cá Rô phi ở nước ta có lịch sử hơn 50 năm, khởi đầu khi nhập nội cá Rô phi đen (*O. mosambicus*) vào nước ta đầu những năm 1950. Những thập niên 50 và 60 của thế kỷ trước, cá Rô phi được nuôi chủ yếu ở hình thức quảng canh và quảng canh cải tiến, nuôi chung cá đực và cá cái. Phong trào nuôi cá Rô phi đặc biệt phát triển từ những năm đầu của thập kỷ 90 sau khi chúng ta nhập lại những dòng cá Rô phi vằn có chất lượng tốt, đặc biệt là cá chọn giống dòng Thái Lan và Israel. Cá được nuôi ở nhiều địa phương với các hình thức khác nhau: nuôi đơn, nuôi ghép,

với mức độ canh tác từ quảng canh, bán thâm canh đến thâm canh.

Theo Cục Thống kê năm 2005, diện tích nuôi cá rô phi của cả nước ta là 22,340 ha chiếm 3% tổng diện tích nuôi trồng thủy sản, trong đó nuôi nước lợ, mặn là 2,068 ha và nuôi nước ngọt là 20,272 ha. Tổng sản lượng cá rô phi ước tính đạt 54,486,8 tấn; chiếm 9,08% tổng sản lượng cá nuôi. Đồng bằng Sông Hồng và Đồng bằng Sông Cửu Long là hai vùng nuôi chủ yếu, lần lượt chiếm 17,6% và 58,4% tổng sản lượng cá rô phi của cả nước. Sản lượng cá rô phi trong cả nước bao gồm: nuôi trong ao và trong đầm 37,931,8 tấn; nuôi lồng 10,182 tấn. Mục tiêu đưa ra đến năm 2015 sản lượng cá cả nước đạt 200,000 tấn/năm; trong đó giành 40% cho xuất khẩu (Phạm Anh Tuấn, 2006).

2.3. Tình hình nghiên cứu dịch bệnh ở cá rô phi

2.3.1. Tình hình nghiên cứu dịch bệnh ở cá rô phi trên thế giới

Cá rô phi là một trong những đối tượng nuôi thủy sản nước ngọt chủ yếu trên thế giới và ở Việt Nam. Theo Gupta M.V và Acosta B.O. (2004) thế giới có khoảng 70 loài cá rô phi khác nhau trong đó có 9 loài đang được nuôi trong các hệ thống khác nhau. Loài nuôi chủ yếu đó là *Oreochromis niloticus* với sản lượng năm 2007 đạt 2.12 triệu tấn (FAO., 2009). Nghề nuôi cá rô phi ngày càng mở rộng và phát triển do có những ưu điểm như nhanh lớn, có khả năng nuôi với mật độ cao, chất lượng thịt ngon và sức chống chịu tốt với các điều kiện môi trường khác nhau (El-Sayed, A.M., 2006). Tuy nhiên cùng với sự phát triển của các hình thức nuôi mới với mật độ cao như nuôi công nghiệp và nuôi thâm canh thì cá rô phi cũng dễ bị nhiễm một số tác nhân gây bệnh như vi rút, vi khuẩn, ký sinh trùng và nấm (Shoemaker, 2008).

Ban đầu, cá rô phi đã được xem là có khả năng đề kháng tốt với vi khuẩn, ký sinh trùng, nấm và virus...so với các loài cá khác trong cùng môi trường nuôi. Tuy nhiên trong thời gian gần đây, cá rô phi đã được tìm thấy là mắc cảm với cả vi khuẩn và ký sinh trùng. Các tác nhân gây bệnh phổ biến cho cá rô phi bao gồm *Streptococcus* spp., *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas hydrophyla*, *Edwardsiella tarda*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Tricodhina* sp., *Gyrodactylus niloticus* (Klesius và ctv, 2008). Điều quan trọng cần lưu ý rằng nhiễm liên cầu

khuẩn đã trở thành một vấn đề lớn trong nuôi cá rô phi và gây thiệt hại kinh tế nặng nề. *Streptococcus iniae* và *Streptococcus agalactiae* là những loài vi khuẩn chính ảnh hưởng đến việc sản xuất cá rô phi trên thế giới (Evan và ctv, 2006).

Tác nhân gây bệnh *Streptococcosis* là nhóm vi khuẩn thuộc giống *Streptococcus* spp. Vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây bệnh ở cá rô phi lần đầu tiên phân lập được ở cá rô phi nuôi tại Nhật Bản gồm hai loài là *Streptococcus shiloi* và *Streptococcus difficile*. Sau đó các loài vi khuẩn gây bệnh trên cá rô phi được phân loại lại như *Streptococcus shiloi* được là *Streptococcus iniae*, còn *Streptococcus difficile* được xác nhận là *Streptococcus agalactiae*.

Vi khuẩn gây bệnh *Streptococcus* gây bệnh trên cá rô phi bao gồm hai loài chính đó là *Streptococcus iniae* và *Streptococcus agalactiae* (Bảng 2.1). Đây là nhóm liên cầu khuẩn gram dương là tác nhân gây bệnh chính trên các hệ thống nuôi cá rô phi thâm canh và gây thiệt hại lớn cho nghề này trên toàn thế giới (Perera R.P., 1994). Vi khuẩn có khả năng phát triển trên các môi trường nuôi cấy khác nhau như Tryptic Soy Agar, Brain Heart Infussion, Muller-Hinton và Blood Agar. Khuẩn lạc của vi khuẩn có kích thước dao động từ 0,5 đến 0,7mm sau 24 giờ nuôi cấy. Vi khuẩn có thể tạo vòng dung huyết trên môi trường thạch máu (Nguyen và Kanai, 1999). *S. iniae* thủy phân esculin và tinh bột, không thủy phân gelatin và có khả năng lên men glucose, maltose, mannitol, sucrose, không lên men arabinose, lactose, raffinose và xylose (Nguyen và Kanai, 1999).

Dịch bệnh ở cá rô phi nuôi ở Thái Lan đã được quan sát thấy trong lồng nuôi trên sông Mekong tại thành phố Mukudahan, phía đông Bắc Thái Lan vào tháng 5 năm 2001. Tỷ lệ cá bị chết do dịch bệnh vào khoảng 40-60% sau hai tuần bị nhiễm bệnh. Dấu hiệu điển hình của cá bị bệnh là chướng bụng, trong xoang bụng chứa dịch và hậu môn bị sưng. Trong năm 2002 và 2003, tại thành phố Lubuk Linggau, miền Nam Sumatra, Indonesia cá rô phi nuôi lồng cũng đã xuất hiện hiện tượng cá bị chết với dấu hiệu bệnh lý hai mắt đục và đổi màu. Vi khuẩn phân lập từ bộ não và các cơ quan khác của cá rô phi bị ảnh hưởng từ Thái Lan và Indonesia đã được xác định là *Streptococcus agalactiae* và *Streptococcus iniae* (Yuasa, 2005).

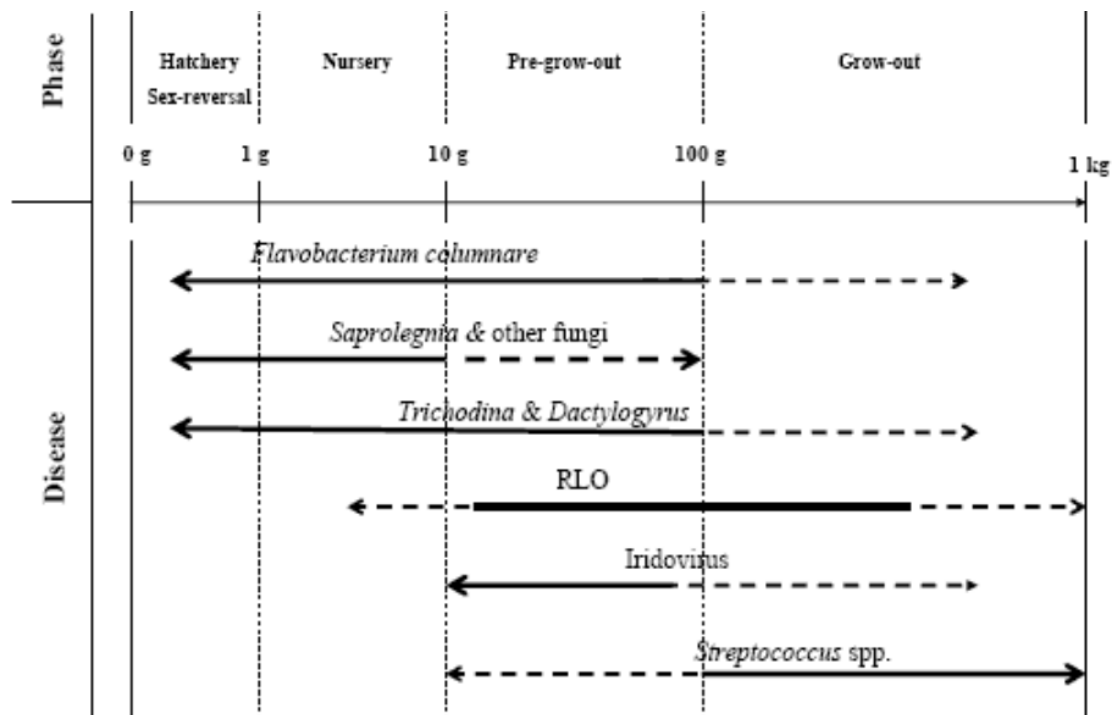
Năm 2005 tại một số hồ chứa của Malaysia đã ghi nhận được hiện tượng cá rô

phi nuôi lồng bị chết, kết quả thu mẫu đã phân lập được vi khuẩn từ các cơ quan. Đặc biệt là mẫu thu ở mắt, thận, não. Trong đó vi khuẩn *S. agalactiae* chiếm 70% tổng số loài vi khuẩn *Streptococcus* được xác định, 30% còn lại là *Leuconostoc spp.* và *S. constellatus*. Dấu hiệu điển hình quan sát bao gồm cá bơi lội không bình thường và bỏ ăn. Hầu như tất cả các cá rô phi bị bệnh mắt như đục giác mạc hoặc tối màu, mắt bị lồi hoặc xẹp (Yuasa, 2005).

Streptococcus agalactiae ngày càng được phát hiện và khẳng định là nguyên nhân gây bệnh cho cá, đặc biệt là cá nước ngọt (Plumb, 1999; Pretto-Giordano và ctv, 2010a). Những năm gần đây rất nhiều đợt dịch bệnh do nhiễm *Streptococcus agalactiae* đã được ghi nhận ở nhiều trang trại nuôi cá rô phi đặc biệt là cá trang trại ở châu Á (Musa và ctv, 2009; Suanyuk và ctv, 2005).

Từ tháng 7 đến tháng 12 năm 2009 bệnh *Streptococcosis* trên cá rô phi đã bùng phát tại bốn tỉnh Guangdong, Guangxi, Hainan and Fujian nơi chiếm tới 90% sản lượng nuôi đối tượng này tại Trung Quốc. Bệnh *Streptococcosis* không chỉ xảy ra tại nơi có sản lượng nuôi cá rô phi lớn nhất thế giới (1.1 triệu tấn năm 2009). Tại Thái Lan theo (Wongtavatchai & Maisak, 2008) tỷ lệ *Streptococcus agalactiae* trên *Streptococcus iniae* là 112/8 ở cá rô phi vằn (*Oreochromis nilotica*), nghiên cứu về dịch tễ học của Intervet/Scheing – Plough Animal Health cho kết quả *Streptococcus agalactiae* chiếm 82% và *Streptococcus iniae* 18% trong tổng số 500 mẫu phân lập từ 13 nước Châu Á và Châu Mỹ La Tinh trong 8 năm (Sheehan và ctv., 2009). Trên cá rô phi đỏ (*Oreochromis spp*) các kết quả đã nghiên cứu của Hernandez và ctv., 2009, Mian và ctv., 2009 và Zamri-saad và ctv., 2010 đều kết luận tác nhân chính gây bệnh *Streptococcosis* là *Streptococcus agalactia*.

Trong mỗi giai đoạn nuôi khác nhau thì cá rô phi thường nhiễm các tác nhân gây bệnh khác nhau theo như hình 2.1.



Hình 2.3: Tác nhân gây bệnh trên cá rô phi ở các giai đoạn nuôi

(Intervet, 2006)

Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy bệnh do vi khuẩn *Streptococcus iniae* và *S. agalactiae* là rất phổ biến và ảnh hưởng đến cá rô phi nuôi tại khu vực Đông nam Á. Kết quả nghiên cứu được tổng hợp theo bảng 2.1.

Bảng 2.1: Vi khuẩn gây bệnh trên cá rô phi nuôi tại khu vực Đông Nam Á (Lauke Labrie, 2007)

Loài vi khuẩn	Số mẫu nhiễm	Số điểm thu	Quốc gia
<i>S. agalactiae</i>	219	22	Indonesia, Singapore,
<i>S. iniae</i>	75	14	Malaysia, Philippin, Thái
<i>Flavobacterium columnare</i>	40	16	Lan, Trung Quốc và Việt nam

2.3.2. Tình hình nghiên cứu dịch bệnh cá rô phi ở trong nước

Nuôi trồng thủy sản là một trong những ngành kinh tế quan trọng của Việt Nam trong việc cung cấp thực phẩm có giá trị cho thị trường trong nước, xuất khẩu thu ngoại tệ và tạo công ăn việc làm cho người dân. Theo thống kê của tổ chức nông

lượng thế giới sản lượng thủy sản của Việt Nam năm 2007 đạt 4.525.750 tấn đứng thứ 3 thế giới sau Trung Quốc và Ấn Độ. Theo cục thống kê tổng sản lượng thủy sản của Việt Nam năm 2009 đạt 4.847 triệu tấn trong đó nuôi trồng thủy sản đạt 2.569 triệu tấn (Cục Thống kê., 2010). Năm 2009 tổng kim ngạch xuất khẩu thủy sản đạt 4.2 tỷ USD chỉ đứng sau xuất khẩu dệt may và dầu thô. Theo báo cáo của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn sản lượng thủy sản của nước ta đứng đầu là cá tra, basa (trên 1 triệu tấn), tiếp đến là tôm sú (413 nghìn tấn) và cá rô phi đứng thứ 3 về sản lượng.

Năm 2009, dịch bệnh gây chết hàng loạt cá rô phi nuôi thương phẩm tại một số tỉnh Miền Bắc Việt Nam. Đây được coi là đợt dịch bệnh lớn nhất kể từ trước đến nay đối với nghề nuôi cá rô phi ở nước ta. Bước đầu, nguyên nhân gây chết đã được xác định đó chính là bệnh *Streptococcosis* do vi khuẩn Gram (+), *Streptococcus* spp. gây ra.

Ở Việt Nam rất nhiều loài cá bị nhiễm vi khuẩn *Streptococcus* spp. từ nước ngọt như cá rô phi, cá trắm cỏ, cá tra, basa, đến các loài cá nước lợ như cá bớp và các loài cá nước mặn như cá song, cá chẽm, cá giò và cá hồng mỹ.

Cá bị bệnh thường có các triệu chứng như cá bơi lơ lờ, mất định hướng, trướng bụng, xuất huyết, lồi mắt, sưng ruột, các cơ quan nội tạng như gan, thận, lá lách bạc màu hoặc xuất huyết, sưng to. Đặc biệt vi khuẩn tấn công niêm mạc mắt và não cá làm cho cá bơi không định hướng và có dấu hiệu tổn thương thần kinh. Bệnh thường xảy ra vào mùa hè đặc biệt khi nhiệt độ nước cao. Đối với mùa đông và mùa xuân, mật độ vi khuẩn thường thấp và không đủ ngưỡng gây bệnh. Tác nhân gây bệnh quan trọng trên cá rô phi thường là vi khuẩn, virus hoặc protozoa... trong đó đáng chú ý nhất là bệnh do vi khuẩn mà đặc biệt là *Streptococcus agalactiae* đã gây chết hàng loạt cá nuôi trong thời gia qua (Đông Thanh Hà và ctv, 2010). Kết quả nghiên cứu của Đinh Thị Thủy, 2007 – các bệnh nguy hiểm thường gặp ở cá rô phi *Oreochromis* spp nuôi thâm canh cho thấy bệnh *Streptococcosis* thường xuất hiện vào mùa hè đặc biệt khi nhiệt độ nước cao, tỷ lệ thiệt hại từ 7 – 10% và cá ở giai đoạn 1 – 4 tháng tuổi. Tại An Giang và Vĩnh Long vi khuẩn *Streptococcus* spp. có tần suất hiện từ 95 – 100% vào tháng 1, tháng 5, tháng 9 và tháng 11 (Đinh Thị

Thủy, 2007). Từ tháng 4 đến tháng 9 năm 2009, hiện tượng cá rô phi bị chết đã xuất hiện ở tất cả các vùng nuôi tập trung ở miền Bắc như Hà Nội, Hải Dương, Hải Phòng, Quảng Ninh, Bắc Ninh, Bắc Giang và Hà Giang. Tỷ lệ chết cao nhất là 100% và trung bình là 42,56%. Đây được coi là đợt dịch bệnh lớn nhất trên cá rô phi nuôi tại miền Bắc Việt Nam. Kết quả nuôi cấy phân lập tác nhân gây bệnh trên cá rô phi cho thấy vi khuẩn gram dương *Streptococcus* spp. có xuất hiện trên mẫu bệnh (Công ty Hanvet, 2009); Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1 thấy trên hầu hết các mẫu bệnh (Khuê, N.V và ctv., 2009).

Kết quả nghiên cứu tác nhân gây bệnh *Streptococcosis* trên cá rô phi cho thấy vi khuẩn *Streptococcus iniae* và *Streptococcus agalactiae* có thể tồn tại ngoài môi trường quanh năm. Ngoài ra vi khuẩn gây bệnh có thể phân lập được từ nguồn đất, chất hữu cơ lắng tụ, chất nhầy của cá. Theo Bromage và ctv, 1999 vi khuẩn gây bệnh *Streptococcus iniae* có thể do cá bị bệnh qua khỏi đợt dịch thải ra ngoài môi trường. Do vi khuẩn gây bệnh *Streptococcosis* thích hợp với điều kiện nhiệt độ cao nên vào mùa đông rất ít khi phân lập được các loài vi khuẩn này.

Và theo Đồng Thanh Hà và ctv, (2010) dịch bệnh xảy ra lần đầu vào mùa hè năm 2009 ở các tỉnh như: Hà Nội, Hải Phòng, Hải Dương, Quảng Ninh, Bắc Ninh, Hà Giang; gây chết với tỷ lệ 90 – 100% cá nuôi (cả cá giống và thương phẩm). Tác giả chỉ ra rằng tác nhân gây bệnh trên cá rô phi ở miền Bắc Việt Nam là *Streptococcus agalactiae* và về khả năng phát triển của vi khuẩn ở 37⁰C và độ mặn 37‰ được xem là yếu tố nguy cơ lây nhiễm bệnh cho động vật có vú và con người. Cũng theo Đồng Thanh Hà và ctv, (2010) vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* có khả năng sống sót tốt trong nước ao và bùn đáy từ 3 – 5 ngày ở hai mức nhiệt độ 25⁰C và 30⁰C. Từ những mẫu cá điêu hồng bị bệnh phù mắt và xuất huyết được thu từ những bè nuôi cá điêu hồng thâm canh ở Tiên Giang tiến hành kiểm tra vi khuẩn học xác định do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây ra (Đặng Thị Hoàng Oanh và ctv, 2012).

Triệu chứng và bệnh tích của cá rô phi khi nhiễm *Streptococcus* spp.: Ở Việt Nam, dịch bệnh hường xảy ra với tỉ lệ cá chết rất cao vào các tháng cuối mùa hè và đầu mùa thu. Đây là khoảng thời gian nhiệt độ nước cao nhất trong năm. Tại

các thời điểm khác trong năm cá chết rải rác, ngoại trừ những tháng mùa đông lúc nhiệt độ nước xuống thấp nhất ở các nước ôn đới không thấy xuất hiện bệnh. Về độ tuổi cá thường có bệnh, hầu hết báo cáo đề cập bệnh xảy ra trong giai đoạn nuôi thương phẩm.

- **Triệu chứng:**

Hành vi bất thường: Cá bị bệnh có triệu chứng chung khá điển hình trên nhiều loài. Do vi khuẩn gây bệnh có hướng tấn công vào hệ thống thần kinh trung ương của cá nên cá bị bệnh sẽ có biểu hiện bị hôn mê và mất phương hướng, cá bơi lơ đãng hay mất định hướng gần mặt nước. Những tổn thương mắt có thể gặp như viêm mắt hoặc lồi mắt, chảy máu mắt. Tuy nhiên, không phải con cá nào bị bệnh cũng bị những tổn thương về mắt.

Các ổ áp-xe: Những con cá bị nhiễm bệnh do vi khuẩn *Streptococcus* spp. thường thấy những vết áp-xe có đường kính từ 2-3mm và những vết loét này nhanh chóng vỡ ra tạo thành những vết lở loét xuất huyết không lành. Những vết áp-xe lớn hơn có thể gặp thấy ở vây ngực và phần đuôi của cá và những vết áp-xe đó có chứa vật chất như mũ ở bên trong.

Xuất huyết ở da: Bệnh do vi khuẩn *Streptococcus* spp. là nguyên nhân gây xuất huyết bên ngoài da. Nhìn chung các điểm xuất huyết thường được nhìn thấy ở quanh miệng cá hoặc ở các góc vây. Đôi khi cũng có thể quan sát thấy những vùng da hơi đỏ xung quanh hậu môn hoặc lỗ sinh dục của cá.

Dịch cổ trướng: Sự có mặt của dịch chất lỏng trong bụng của cá là dấu hiệu của dịch bệnh ở thời kỳ cấp tính. Bên ngoài cá có biểu hiện bị trướng bụng. Dịch này có thể được nhìn thấy chảy ra từ hậu môn của cá.

- **Bệnh tích:**

Các dấu hiệu bên trong bệnh này có nhiều điểm tương đồng với bệnh nhiễm trùng máu của cá:

Cá bỏ ăn: Nhìn chung không có sự hiện diện của thức ăn khô trong dạ dày hoặc ruột của những con cá bị bệnh. Tuy nhiên trong các ao nuôi cá thương phẩm khi cá bị bệnh ở giai đoạn đầu bệnh mới bùng phát cá vẫn có thể ăn bằng cách lọc thức ăn. Khi ruột và dạ dày của cá trống rỗng thức ăn thì sẽ quan sát thấy túi mật rất to, đó là

đặc trưng của sự vắng mặt hoạt động tiêu hóa trong cơ thể.

Nhiễm trùng máu: Trong giai đoạn cấp tính của bệnh vi khuẩn nhanh chóng đi đến hệ thống máu và lan toả đến tất cả các cơ quan nội tạng. Những dấu hiệu lâm sàng chính liên quan đến sự nhiễm trùng máu là sự xuất huyết, viêm gan, thận, lá lách, tim, mắt và ống ruột. Lá lách thường mở rộng ra (trương và sung nhẹ).

Viêm màng bụng: Khi cá bị nhiễm bệnh nặng có sự dính nhau của các cơ quan nội tạng với màng trong khoang bụng của cá. Hơn nữa lúc này sự hiện diện của các tơ huyết (fibrinous) có thể được quan sát thấy trong màng ở khoang bụng của cá.

Ngoài ra khi cá bị nhiễm bệnh nặng, bệnh còn kết hợp với những vi khuẩn cơ hội khác gây bệnh cho cá có sẵn trong môi trường như vi khuẩn *Aeromonas spp.* ở nước ngọt hay vi khuẩn *Vibrio spp.* ở nước lợ.

- **Sự phân bố và lan truyền của bệnh**

Dịch bệnh thường xảy ra khi cá nuôi tiếp xúc với sự căng thẳng (stress) khi nhiệt độ nước tăng, lượng oxy trong nước thấp dưới mức cho phép hoặc cá bị nuôi ở mật độ cao trong thời gian dài.

Về mặt lý thuyết thì bệnh lây nhiễm cho cá ở mọi lứa tuổi, kích cỡ. Tuy nhiên cá có kích thước lớn (từ 100g đến cỡ thương phẩm) dễ bị mắc bệnh hơn cá.

Bệnh ở giai đoạn cấp tính với đỉnh điểm tử vong trong khoảng từ 2 – 3 tuần khi nhiệt độ nước cao. Tuy nhiên bệnh cũng có thể ở giai đoạn mãn tính khi nhiệt độ nước thấp có thể làm giảm tỷ lệ chết.

Bệnh lây lan theo chiều ngang từ cá với cá (cá khỏe ăn cá bị bệnh, ăn thịt lẫn nhau, do vết thương trên da...) và cũng có thể lây truyền từ môi trường đến cá.

- **Cơ chế lây nhiễm của vi khuẩn *Streptococcus spp.***

Streptococcus spp. cho ra ngoại độc tố, phá hỏng các khí quan trong cơ thể cá, dẫn đến làm cho cá bị rối loạn chức năng như khi vi khuẩn tấn công vào hệ thống thần kinh trung ương của cá làm cá có biểu hiện bị hôn mê và mất phương hướng. Do vậy khi chữa bệnh không chỉ diệt mầm bệnh mà đồng thời phải dùng thuốc để giải các độc tố hoặc nâng cao khả năng tự giải độc trong cơ thể vật nuôi.

Streptococcus spp. trực tiếp phá hỏng hệ thống máu, gây nên hiện tượng cá bị xuất huyết toàn thân, hiện tượng này đối với vật nuôi rất quan trọng, ảnh hưởng đến toàn thân vật nuôi, khí quan và hệ thống máu bị tổn hại, lúc đó bệnh rất khó chữa.

Hiện nay chưa có bất kỳ loại vaccin phòng bệnh *Streptococcosis* gây bệnh trên cá rô phi được nghiên cứu và ứng dụng vào sản xuất tại Việt Nam. Vì vậy, việc phân lập và xác định đặc tính sinh học của *Streptococcus* spp. là cần thiết để giúp cho việc nghiên cứu và sản xuất vaccine phòng bệnh *Streptococcosis* trên cá rô phi nuôi tại Việt Nam là rất cần thiết.

2.4. Tình hình sử dụng thuốc trong nuôi trồng thủy sản

Vấn đề sử dụng thuốc kháng sinh nói riêng và hóa chất nói chung trong nuôi trồng thủy sản cho đến nay tương đối phổ biến. Song một nghịch lý xảy ra là chưa có thuốc kháng sinh dùng riêng cho động vật thủy sản mà đa phần chúng đều dùng của người và gia súc (Inglis, V. 2000). Trước đây chỉ có một số hóa chất và thuốc kháng sinh được sử dụng như vôi bột, formalin, sulfate đồng, thuốc tím, dipterex, rotanon và một số thuốc như chloramphenicol, furazolidon, tetracyclin... được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản. Ngày nay có rất nhiều chủng loại thuốc, hóa chất và chế phẩm sinh học được sử dụng. Đã có hiện tượng nhờn thuốc trong các trại sản xuất tôm giống ở nước ta (Phillips Michael, 2000). Tuy nhiên, thực tế sản xuất, kinh doanh và sử dụng cũng như quản lý các sản phẩm như thế nào là điều cần phải xem xét.

Chỉ xét riêng ở Khánh Hòa với 65 trại sản xuất giống thủy sản đã sử dụng 44 loại kháng sinh, mỗi trại trung bình dùng 5,8 loại. Trong số 44 loại thuốc thì có 5 loại là kháng sinh chữa bệnh cho người (streptomycin, chloramphenicol, rifampicin, furazonidon, erythromycin). Các loại thuốc, hóa chất, chế phẩm sinh học dùng trong nuôi trồng thủy sản tại khu vực nuôi Hải Phòng và Quảng Ninh có 10 loại thuốc bao gồm: oxytetracycline, chloramphenicol, rifampicin, ampicilin, cloxyte, ND gentosine, panamin, penicillin, tetracyclin thường được dùng để phòng và trị bệnh cho cá trong suốt quá trình nuôi, ngoài ra còn có một số loại thuốc không rõ nhãn mác và hướng dẫn sử dụng ghi trên bao bì do nhập lậu từ Trung Quốc, hoặc nhãn mác được viết bằng tiếng Trung Quốc (Mai Văn Tài, 2004).

Khi vấn đề sử dụng thuốc kháng sinh tăng lên theo cấp số cộng đồng thời dư lượng kháng sinh trong các sản phẩm thủy sản xuất khẩu trở nên bức xúc. Hơn thế nữa để nâng cao chất lượng sản phẩm đáp ứng nhu cầu tiêu dùng của người dân

cũng như yêu cầu của các nước nhập khẩu. Chính phủ cũng như Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã có nhiều biện pháp kịp thời ngăn chặn việc dùng các chất cấm. Ngày 17/03/2009 Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn ban hành thông tư số 15/2009/TT-BNN về danh mục thuốc, hóa chất, kháng sinh cấm sử dụng, hạn chế sử dụng trong sản xuất kinh doanh thủy sản; và Thông tư số 03/2012/TT-BNNPTNT ngày 16 tháng 01 năm 2012 về việc sửa đổi, bổ sung Thông tư số 15/2009/TT-BNN. (Phụ lục 1)

Song song với vấn đề dư lượng thuốc trong sản phẩm thủy sản thì vấn đề kháng thuốc của vi khuẩn cũng đã được đề cập và quan tâm. Một trong số những nguyên nhân gây ra hiện tượng vi khuẩn kháng lại thuốc kháng sinh là do người dân sử dụng thuốc có tính chất lạm dụng thuốc, dùng không đúng liều lượng, dùng một cách tràn lan.

3. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

3.1.1. Thời gian nghiên cứu

Đề tài được thực hiện từ tháng 04/2012 đến tháng 08/ 2013.

3.1.2. Địa điểm nghiên cứu

Mẫu bệnh được thu tại 4 tỉnh miền Bắc : Hà Nội, Hải Dương, Hải Phòng, Quảng Ninh.

Thí nghiệm được thực hiện tại : Cục Thú y và Công ty Hanvet - 88, Trường Chinh, Đống Đa, Hà Nội.

3.2. Nội dung nghiên cứu

Trong khuôn khổ của đề tài, chúng tôi thực hiện các nội dung nghiên cứu sau:

- Phân lập vi khuẩn *Streptococcus* spp. từ cá rô phi bị bệnh xuất huyết
- Xác định một số đặc tính sinh học của vi khuẩn *Streptococcus* spp. phân lập được.
- Xác định độc lực của vi khuẩn *Streptococcus* spp. phân lập được.
- Xác định tính kháng nguyên của vi khuẩn *Streptococcus* spp. phân lập được.
- Kiểm tra khả năng miễn cảm với kháng sinh của vi khuẩn *Streptococcus* spp. phân lập được.

3.3. Vật liệu nghiên cứu

3.3.1. Dụng cụ, thiết bị phục vụ nghiên cứu

- Dụng cụ:

Dụng cụ thu mẫu: bông thấm côn, túi PE đã tiệt trùng, bộ giải phẫu (panh, kéo, dao...)

Dụng cụ dùng để phân tích và nghiên cứu vi khuẩn : Ống nghiệm, đĩa petri, đầu côn, ống eppendorf, ống ficol, que cấy, đèn côn, dụng cụ dùng để nhuộm gram...

Dụng cụ dung để chế chất gây đáp ứng miễn dịch và đánh hiệu giá kháng thể: kim tiêm, lam kính...

- Thiết bị:
 - + Nồi hấp khử trùng
 - + Tủ ấm
 - + Tủ lạnh
 - + Bể ổn nhiệt
 - + Máy đo pH
 - + Tủ cấy vô trùng
 - + Máy sục khí
 - + Máy khuấy từ
 - + Máy vortex
 - + Máy lắc ổn nhiệt
 - + Máy đo OD
 - + Máy ly tâm
 - + Kính hiển vi quang học
 - + Cân điện tử
 - + Pipet tự động

3.3.2. Môi trường, hóa chất phục vụ nghiên cứu

- Môi trường:

Môi trường dùng để pha loãng vi khuẩn: nước muối sinh lý 0.85%.

Môi trường tăng sinh vi khuẩn: Brain heart infusion broth (BHIB, Merck)

Môi trường thạch nuôi cấy vi khuẩn: Brain heart infusion agar (BHIA, Merck)

BHI có bổ sung 5% máu hoặc trên môi trường thạch máu (Blood agar)

- Hóa chất:

H₂O₂, NaOH, HCl, xylene, formalin, cồn.

Các hóa chất dùng trong lập kháng sinh đồ.

Kit API20 Strep (BioMerieux, Pháp).

Kit Strep-B-Latex (GBS) (Đan mạch)

3.3.3. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu vi khuẩn *Streptococcus* spp. sử dụng trong đề tài được phân lập từ mẫu cá rô phi với các dấu hiệu bệnh lý như bơi lơ đờ, mất định hướng, trướng bụng, xuất huyết, lồi mắt, sung ruột, các cơ quan nội tạng như gan, thận, lá lách bạc màu hoặc xuất huyết, sung to, bơi không định hướng và có dấu hiệu tổn thương thần kinh thu tại 4 tỉnh miền Bắc : Hà Nội, Hải Dương, Hải Phòng, Quảng Ninh.

Cá dùng thí nghiệm: cá rô phi có khối lượng khoảng 60g, khỏe mạnh, màu sắc

cá tươi sáng, đầy đủ các bộ phận và bơi lội bình thường, được nuôi thuần trong bể nuôi phòng thí nghiệm (khoảng 3 tuần trước khi cảm nhiễm) để tạo sự ổn định hơn về điều kiện sống, các yếu tố môi trường, ngoại cảnh tác động đến quá trình sống của cá so với cá sống bên ngoài tự nhiên.

3.4. Phương pháp nghiên cứu

Các thao tác phải được thực hiện trong điều kiện vô trùng.

Làm thuần vi khuẩn: dùng que cấy lấy vi khuẩn cấy lên môi trường BHIA. Đem ủ ở 28⁰C - 30⁰C trong 18-24 giờ kiểm tra kết quả.

Nuôi tăng sinh vi khuẩn: chọn một khuẩn lạc từ đĩa cấy thuần cho vào bình tam giác chứa 25ml BHI đặt vào tủ nuôi lắc ổn nhiệt 200 vòng/phút sau 18 – 24 giờ. Kiểm tra kết quả.

Mỗi chỉ tiêu kiểm tra sinh hóa được lặp lại 3 lần.

3.4.1. Phương pháp thu mẫu cá bệnh

- Dụng cụ: túi nilon và găng tay.
- Nguyên tắc thu mẫu cá bệnh:

Phải kiểm tra ngay khi cá được vớt lên khỏi mặt nước, các biểu hiện bệnh tích bên ngoài. Ghi các triệu chứng cá bệnh trước khi thu mẫu.

Cơ quan sử dụng để nuôi cấy phân lập vi khuẩn bao gồm gan, thận, lách, não và mắt của cá rô phi có dấu hiệu bệnh điển hình, cá còn đang sống hoặc mới chết.

Triệu chứng đặc trưng của cá: dấu hiệu bên ngoài (cá có biểu hiện bất thường, lồi mắt hoặc nổi mắt, có các ổ áp-xe, xuất huyết ở da, dịch cổ trướng), dấu hiệu bên trong (viêm màng bụng, túi mật rất to, nhiễm trùng máu).

Dùng găng tay cho mẫu cá bệnh vào túi nilon.

Thu mẫu cá bệnh vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm trong thời gian ngắn nhất.

3.4.2. Phương pháp mổ cá để lấy nội tạng

*** Cá được mổ bằng ba đường cắt:**

Đường thứ nhất: bắt đầu từ trước hậu môn, theo đường giữa thành bụng cho đến phân đầu, dừng trước nắp mang.

Đường thứ hai: bắt đầu từ trước hậu môn, chạy lên phía trên, dọc theo thành

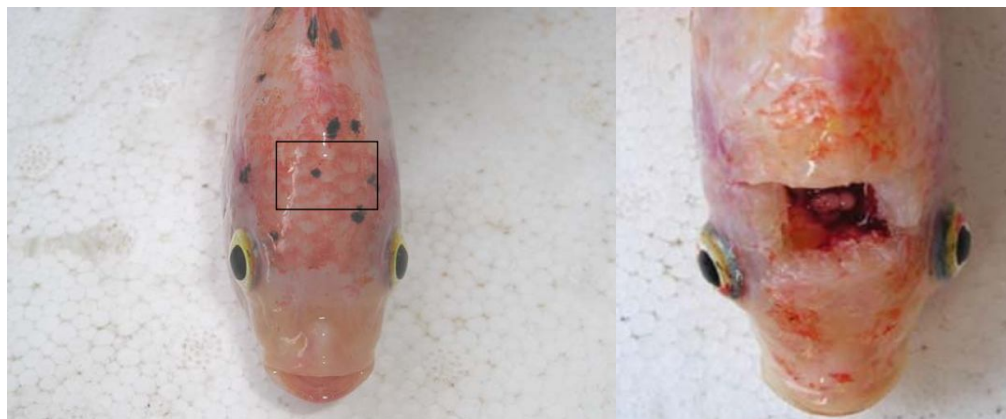
ngực đến phần mang cá.

Đường thứ ba: nối hai đường thứ nhất và hai lại.



Hình 3.1. Cách mổ xoang bụng cá

* **Mổ sọ não cá:** Sát trùng mặt ngoài của vùng da phần sọ não cá bằng cồn 70°. Sau đó cắt bốn đường cắt, mỗi đường cắt khoảng 0,5 – 1 cm sao cho lộ phần não ra.

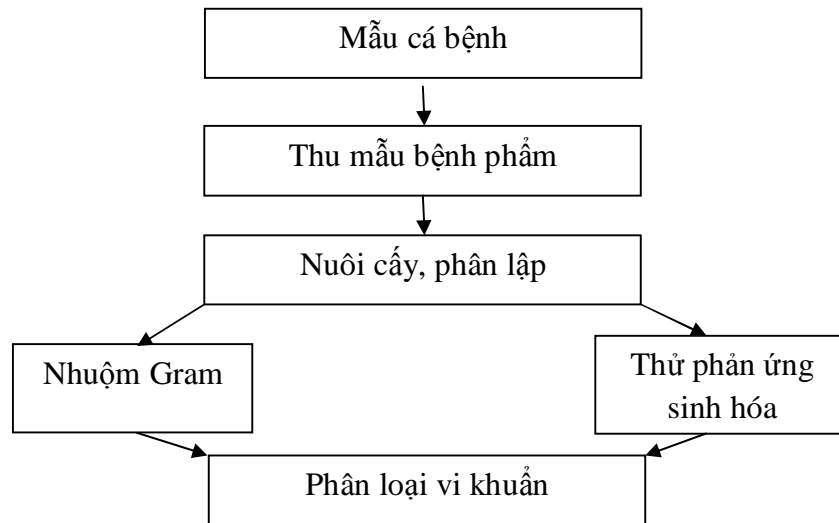


Hình 3.2. Cách mổ não cá

3.4.3. Phương pháp phân lập vi khuẩn *Streptococcus* spp. có trong mẫu bệnh phẩm

Nuôi cấy và phân lập vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây bệnh trên cá rô phi bằng phương pháp nghiên cứu vi khuẩn của Frerich G.N. (1993), thử các đặc tính sinh học bằng test API20Strep.

Phân lập vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy BHI có bổ sung 5% máu hoặc trên môi trường thạch máu (Blood agar). Các chủng vi khuẩn phân lập được trữ ở -80°C trong môi trường Brain heart infusion broth (BHIB, Merck) có 25% glycerol.



Hình 3.3. Sơ đồ nuôi cấy, phân lập vi khuẩn *Streptococcus spp.*

4.4.4. Phương pháp đếm mật độ vi khuẩn

Phương pháp xác định gián tiếp số lượng tế bào bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch.

Pha loãng dịch huyền phù tế bào theo cơ số 10 thành các nồng độ: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ...tiến hành cấy mẫu ở các độ pha loãng khác nhau vào các đĩa petri (mỗi nồng độ cấy lặp ba lần).

Đặt các đĩa thạch vừa cấy vào tủ ẩm ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ.

Kết thúc thời gian ủ, lấy ác đĩa thạch ra, tiến hành đếm khuẩn lạc và tính số lượng tế bào trong 1 ml mẫu theo công thức:

$$M_i(\text{CFU/ml}) = A_i \times D_i/V$$

Trong đó : A_i : là số khuẩn lạc trung bình/ đĩa

D_i : là độ pha loãng

V : là dung tích huyền phù tế bào cho vào mỗi đĩa (ml)

Mật độ tế bào trung bình M_I trong mẫu ban đầu là trung bình cộng của M_i ở các nồng độ pha loãng khác nhau.

3.4.5. Phương pháp định danh vi khuẩn *Streptococcus spp.*

Hình dạng, kích thước 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, đẩy bằng lamén và quan sát bằng kính hiển vi ở vật kính 40X. Các đặc tính 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).

3.4.5.1. Xác định các chỉ tiêu cơ bản

(Theo cẩm nang Cowan và Steel (Barrow và Feltham, 1993))

✓ **Quan sát tính di động**

Tiến hành thử nghiệm trên môi trường thạch bán lỏng, nhằm xác định khả năng di động của vi khuẩn trên môi trường thạch bán lỏng (Brain heart infusion agar 0,6 %).

+ Kết quả:

Vi khuẩn di động: sẽ phát triển lan ra khỏi vết cấy, làm nhòe đường cấy.

Vi khuẩn không di động: sẽ phát triển quanh đường cấy.

✓ **Nhuộm Gram**

Từ đĩa thạch cấy vi khuẩn đã được làm thuần, chọn những khuẩn lạc rời có thời gian ủ 24 - 72 giờ tiến hành nhuộm gram.

+ Quan sát trên kính hiển vi

Vi khuẩn bắt màu tím đỏ là vi khuẩn G⁺.

Vi khuẩn bắt màu hồng là vi khuẩn G⁻.

✓ **Phản ứng oxidase**

Thử nghiệm này nhằm xác định sự hiện diện của enzyme oxidase.

+ Đọc kết quả:

Nếu sau 10 giây vết bôi vi khuẩn chuyển sang màu tím đen: Phản ứng oxidase cho kết quả dương tính.

Nếu sau 60 giây mới chuyển màu: Phản ứng oxidase cho kết quả âm tính.

✓ **Phản ứng catalase**

Nhằm xác định sự có mặt của enzyme catalase của một số vi khuẩn hô hấp kỵ khí tùy ý.

+ Đọc kết quả:

Kết quả được đọc ngay sau 1 – 2 giây.

Phản ứng dương tính: Xuất hiện bọt khí.

Phản ứng âm tính: Không có bọt khí.

✓ **Khả năng lên men và oxy hóa đường glucose (Fermentation/oxidation: O/F)**

Dùng để kiểm tra khả năng sử dụng glucose của vi khuẩn trong điều kiện có oxy và không có oxy.

- Kết quả:

Cách đọc kết quả phản ứng O – F test

Ống không phủ dầu Paraffin	Ống phủ dầu paraffin	Kết quả
Xanh lá cây	Xanh lá cây	Không phản ứng với glucose
Xanh lơ ở phần trên	Xanh lá cây	Phản ứng kiềm tính
Vàng	Xanh lá cây	Phản ứng oxy hóa
Vàng	Vàng	Phản ứng lên men

- **Định danh bằng bộ kit API 20 Strep (Biomérieux)**

Kiểm tra các phản ứng sinh lý và sinh hóa của *Streptococcus* sp sử dụng bộ kit API 20 Strep của hãng Biomérieux.

Các chỉ tiêu cơ bản (hình dạng, khả năng di động, oxidase, catalase và phản ứng O/F) được thực hiện trước khi sử dụng bộ kit API 20 Strep.

Bộ kit gồm 20 giếng với 9 giếng nhỏ gồm các phản ứng: VP, HIP, ESC, PYRA, α GUR, β GAL, PAL, LAP; và 11 giếng lớn gồm các phản ứng: ADH, RIB, ARA, MAN, SOR, LAC, TRE, INU, RAF, AMD, GLYG.

- Nguyên lý:

Phương pháp này cho phép định tên một số loài liên cầu và vi khuẩn đường ruột. Kit API 20Strep gồm các ống nghiệm nhỏ (microtube) trong có chứa các chất nền đã khử nước. Trong quá trình ủ, hoạt động của vi khuẩn sẽ làm chuyển màu hoặc làm đục môi trường. Đọc kết quả sau 4giờ và 24giờ bằng cách quan sát các phản ứng chuyển màu khi tiếp xúc với những thuốc thử, đối chiếu với bảng kết quả chuẩn

để định danh vi khuẩn bằng phần mềm: <https://apiweb.biomerieux.com>

- Các bước tiến hành:

Chuẩn bị khay ủ: Cho 5 ml nước muối sinh lý vào trong khay để giữ ẩm trong suốt quá trình ủ.

Tạo huyền phù: Lấy một khuẩn lạc đã được phân lập vào 0,3 ml nước muối sinh lý để tạo huyền phù.

Hút 100 µl huyền phù cho vào một nửa số giếng từ VP – LAP. Riêng giếng ADH cho đầy miệng giếng.

Cho 0,5 ml huyền phù vào ống API GP medium, sau đó cho vào mỗi giếng từ giếng RIB tới giếng GLYG.

Cho paraffin vô trùng vào các giếng từ giếng ADH đến giếng GLYG.

Đậy nắp khay lại, đem ủ bộ test định danh ở tủ ẩm ở 30 °C.

• Đọc kết quả và thêm hóa chất:

Sau 4 giờ đem khay ra khỏi tủ ủ và nhỏ hóa chất vào các giếng:

Giếng VP: nhỏ vào một giọt VP1, VP2.

Giếng HIP: nhỏ 2 giọt NIN.

Giếng PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL và LAP: nhỏ một giọt ZYMA và một giọt ZYMB.

10 phút sau đọc kết quả lần 1. Đem ủ bộ kit thêm 24 giờ nữa sau đó đọc kết quả lần 2.

**Bảng 3.1. Thuốc thử và cách đọc kết quả các phản ứng sinh hóa
trong API 20 Strep**

Tests	Kết quả			
	Âm tính (-)		Dương tính (+)	
VP	VP1 + VP2 / đợi 10 phút			
	Không màu		Đỏ hồng	
HIP	NIN / đợi 10 phút			
	Không màu / xanh nhạt / xám nhạt		Xanh sẫm / tím	
ESC	4 giờ	24 giờ	4 giờ	24 giờ
	Không màu / vàng nhạt	Không màu / vàng nhạt / xám nhạt	Đen / xám	Đen
PYRA	ZYM A + ZYM B / đợi 10 phút (PYRA đến LAP)			
	Không màu / cam rất nhạt		Cam	
α GAL	Không màu		Tím	
β GUR	Không màu		Xanh	
β GAL	Không màu / tím rất nhạt		Tím	
PAL	Không màu / tím rất nhạt		Tím	
LAP	Không màu		Cam	
<u>ADH</u>	Vàng		Đỏ	
<u>RIB</u>	4 giờ	24 giờ	4 giờ	24 giờ
	Đỏ	Cam / đỏ	Cam vàng /	Vàng
<u>ARA</u>	Đỏ	Cam / đỏ	Cam vàng /	Vàng
<u>MAN</u>	Đỏ	Cam / đỏ	Cam vàng /	Vàng
<u>SOR</u>	Đỏ	Cam / đỏ	Cam vàng /	Vàng
<u>LAC</u>	Đỏ	Cam / đỏ	Cam vàng /	Vàng
<u>TRE</u>	Đỏ	Cam / đỏ	Cam vàng /	Vàng
<u>INU</u>	Đỏ	Cam / đỏ	Cam vàng /	Vàng
<u>RAF</u>	Đỏ	Cam / đỏ	Cam vàng /	Vàng
<u>AMD</u>	Đỏ	Cam / đỏ	Cam vàng /	Vàng
<u>GLYG</u>	Cam / đỏ		Vàng	

Phản ứng Hemolysis

Nhằm xem khả năng tiêu máu của vi khuẩn trên môi trường thạch máu.

+ Cách tiến hành:

Sử dụng que cấy vô trùng lấy 1 khuẩn lạc và cấy ria lên môi trường thạch máu, thực hiện các thao tác trong tủ cấy vi sinh.

+ Kết quả:

α – hemolysis xuất hiện vòng dung huyết màu xanh.

β – hemolysis xuất hiện vòng dung huyết trong suốt xung quanh khuẩn lạc.

γ – hemolysis không có vòng dung huyết.

- **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 μ l/giọt) được nhỏ lên hai lam. Dùng que cấy tiệt 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 tấm tiệt trùng trộn đều 2 dung dịch. Phản ứng dương tính sẽ có ngưng kết xuất hiện trong 5 – 10 giây giúp xác định *Streptococcus* spp. có kiểu huyết thanh Ib (serotype Ib) hay kiểu sinh học 2 (biotype 2).

3.4.6. Phương pháp xác định độc lực của các chủng vi khuẩn *Streptococcus* spp.

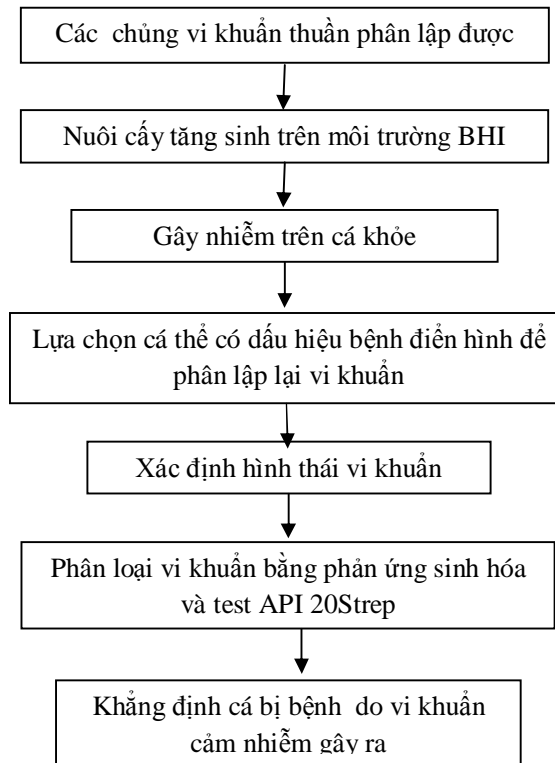
Thử độc lực của vi khuẩn bằng phương pháp gây nhiễm vi khuẩn *Streptococcus* spp.. Thí nghiệm được bố trí trong phòng thí nghiệm ướt có điều khiển được chất lượng nước và nhiệt độ, vi khuẩn được tiêm vào xoang bụng của cá. Cá sử dụng làm thí nghiệm có khối lượng khoảng 60 gram/con, gồm 4 lô (3 lô thí nghiệm và 1 lô đối chứng), mỗi lô 20 con. Gây nhiễm vi khuẩn với các nồng độ từ 10^6 – 10^{10} cfu/cá thể. Lô đối chứng sử dụng nước muối sinh lý 0.85% (bảng 3.2). Tiến hành theo dõi, quan sát, thu thập số liệu và tiến hành phân lập lại vi khuẩn từ các cá thể cá có dấu hiệu bệnh điển hình (phân lập từ tổ chức gan, thận, não, mắt). Thời gian theo dõi một lần thí nghiệm kéo dài 4 tuần.

Bảng 3.2. Bố trí thí nghiệm xác định độc lực vi khuẩn gây bệnh xuất huyết ở cá rô phi

Nồng độ vi khuẩn gây bệnh	Chủng vi khuẩn xác định độc lực
Lô đối chứng	20 cá/bể x 3 bể
10^6 cfu/ml	20 cá/bể x 3 bể
10^7 cfu/ml	20 cá/bể x 3 bể
10^8 cfu/ml	20 cá/bể x 3 bể
10^9 cfu/ml	20 cá/bể x 3 bể
10^{10} cfu/ml	20 cá/bể x 3 bể
Tổng	360 con x 52 chủng = 18720 con cá

Các bước tiến hành thử nghiệm độc lực của vi khuẩn:

- Nuôi cấy tăng sinh các dòng vi khuẩn đã chọn được từ các vùng khác nhau trên môi trường (BHI) lỏng ở 30°C trong vòng 24 giờ theo phương pháp của Hernandez và ctv., 2009.
- Định lượng vi khuẩn bằng phương pháp đếm khuẩn lạc.
- Gây bệnh nhân tạo bằng phương pháp tiêm xoang bụng sau khi cá đã được gây mê bằng MS 222 với nồng độ 50-75ppm.
- Bố trí các lô thí nghiệm trong phòng thí nghiệm ướt. Mỗi nồng độ thí nghiệm lặp lại 3 lần.
- Theo dõi thí nghiệm, ghi chép số lượng cá chết và kết thúc thí nghiệm sau khi cá ngừng chết 3 ngày liên tục. Thời gian thí nghiệm kéo dài trong 4 tuần.
- Tiến hành phân lập lại vi khuẩn từ mẫu cá bệnh điển hình sau khi gây bệnh nhân tạo trên môi trường BHIA, kiểm tra hình thái vi khuẩn, thử phản ứng sinh hóa và test API20 Strep để khẳng định cá bị bệnh do vi khuẩn cảm nhiễm gây ra (Hình 3.4)



Hình 3.4. Sơ đồ bố trí thí nghiệm gây bệnh cho cá rô phi

- Tăng cường độc lực của các chủng vi khuẩn phân lập

Các chủng vi khuẩn sau khi được xác định có độc lực, để đảm bảo độ ổn định về đặc tính cũng như tăng cường độc lực của vi khuẩn. Chúng tôi tiến hành tiếp đời liên tục qua cá rô phi (vật chủ chính của vi khuẩn) sau đó tái phân lập lại chủng vi khuẩn và giữ giống để phục vụ nghiên cứu sản xuất kit chẩn đoán và vacxin.

Các bước tiến hành:

- Nuôi cấy tăng sinh các chủng vi khuẩn trên môi trường BHIB.
- Gây nhiễm thực nghiệm với liều gây chết
- Phân lập lại vi khuẩn trên cá bị bệnh.

Như vậy, sau bước này chúng ta đã tuyển chọn được các chủng *Streptococcus* spp. có độc lực cao, ổn định về đặc tính và có mã trình tự gen tương đồng để làm bộ giống chuẩn.

3.4.7. Phương pháp xác định tính kháng nguyên

Nghiên cứu này nhằm chọn ra những chủng vi khuẩn có kháng nguyên đáp ứng miễn dịch tốt để phục vụ nghiên cứu sản xuất vacxin.

Chế tạo kháng nguyên riêng biệt cho từng chủng vi khuẩn để tiêm miễn dịch cho cá rô phi với liều 0,1ml/con vào xoang bụng, mỗi chủng cho 10 con (mỗi chủng lặp 3 lần). Sau 21 ngày tiến hành lấy máu và xác định hiệu giá kháng thể của huyết thanh.

- Chế tạo kháng nguyên cho từng chủng vi khuẩn:

Sau 24 giờ vi khuẩn tăng sinh mạnh, sau đó bất hoạt vi khuẩn bằng Formalin với liều lượng được tính bằng công thức:

$$V_{\text{Formalin}} = 0,5\% \times V_{\text{dd}}$$

Trong đó: V_{Formalin} : Thể tích Formalin

V_{dd} : Thể tích dung dịch của môi trường canh BHI

Bảo quản trong điều kiện 4⁰C khoảng 24 – 48 giờ

Sau khi bất hoạt vi khuẩn bằng Formalin, ta tiến hành thu nhận vi khuẩn bằng cách ly tâm môi trường đã nuôi tăng sinh vi khuẩn lấy phần cô đặc nằm dưới đáy ống ly tâm, có màu trắng.

Thực hiện ly tâm 5000 vòng/phút trong vòng 15 phút.

Rửa phần cô đặc bằng nước muối sinh lý 3 lần. Sau mỗi lần rửa ly tâm lại để rửa sạch hết formalin.

Sau khi rửa ta đem pha với nước muối sinh lý đạt nồng độ 10⁹ cfu/ml. Bảo quản ở nhiệt độ 4 – 10⁰C.

- Tạo kháng thể bằng cách tiêm vào cơ thể cá rô phi:

Lựa chọn cá rô phi khỏe mạnh, không bị nhiễm bệnh, không bị dị hình. Cá có khối lượng 60 – 70g.



Hình 3.5. Cá rô phi thí nghiệm

Tiêm hỗn hợp dung dịch huyền phù vi khuẩn – nước muối sinh lý vào xoang bụng của cá với liều lượng 0,1ml/lần.

Quan sát tình trạng sức khỏe của cá trong suốt quá trình tạo kháng thể.

- Kiểm tra kháng thể:

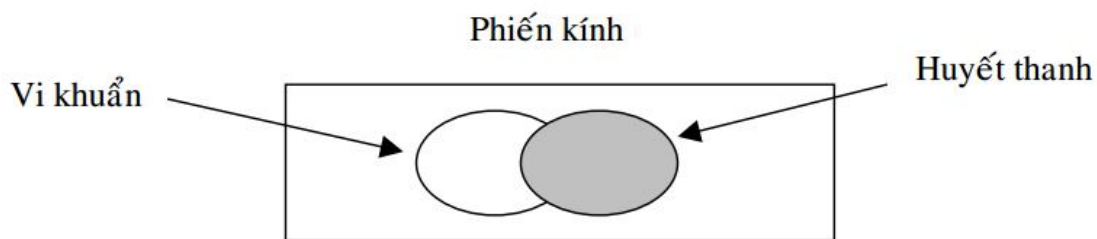
Kiểm tra xem trong huyết thanh cá có kháng thể kháng liên cầu khuẩn hay không. Sử dụng vi khuẩn *Streptococcus* spp. được phân lập từ cá bệnh qua các lần thu mẫu và cá gây bệnh thực nghiệm.

Phương pháp kiểm tra: lấy máu cá cho vào ống nghiệm đặt nghiêng và để yên từ 1 – 2 giờ và giữ lạnh khoảng 1 giờ, sau đó đem ly tâm với tốc độ 2000 vòng/phút trong vòng 15 phút.

Sau đó hút lấy huyết thanh là phần trong nằm ở trên có màu vàng nhạt ta thực hiện phản ứng ngưng kết với vi khuẩn sống và vi khuẩn đã được bất hoạt bằng formalin để kiểm tra xem có kháng thể kháng liên cầu khuẩn hay không.

- Thực hiện phản ứng ngưng kết trên phiến kính:

Nhỏ vài giọt huyết thanh – vi khuẩn sống, huyết thanh – vi khuẩn bất hoạt trên phiến kính quan sát trong vòng 2 phút. Đối với vi khuẩn sống, dùng que cấy vòng lấy một ít vi khuẩn thuần đang nuôi trên đĩa thạch hòa vào vài giọt nước muối sinh lý đã có sẵn trên lame và cùng hòa với vài giọt huyết thanh quan sát trong vòng 2 phút. Sau đó thu nhận kết quả.



Để kiểm tra xem hoạt lực của kháng thể có mạnh hay không ta pha loãng huyết thanh ra làm 2, 4, 8 lần sau đó kiểm tra như trên.

Nếu trên kính có nhiều ngưng kết màu trắng đục li ti thì ta thu được kết quả có kháng thể kháng vi khuẩn *Streptococcus* spp.

- Thực hiện phản ứng trên microplate 96 giếng

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Đĩa microplate 96 giếng (đáy hình chữ “U”)

Phương pháp thực hiện trên đĩa microplate 96 giếng theo các bước như sau:

- ✓ Thêm 25µl nước muối sinh lý vào tất cả các giếng trừ cột thứ nhất.
- ✓ Cho 25µl huyết thanh vào các giếng ở cột 1 và cột 2.
- ✓ Dùng pipette để trộn hỗn hợp trong giếng thứ 2. Như vậy, ta sẽ thu được hỗn hợp huyết thanh pha loãng 2 lần.
- ✓ Chuyển 25µl của giếng thứ 2 sang giếng thứ 3 rồi trộn hỗn hợp cho đều. Tiếp tục như thế cho đến giếng thứ 12. Cuối cùng, ta được một dãy pha loãng bậc 2.
- ✓ Thêm 25µl huyền phù vi khuẩn vào mỗi giếng rồi bọc đĩa lại bằng một miếng phim. Lắc nhẹ đĩa trên mặt phẳng bàn để hỗn hợp hòa trộn lại với nhau.

Bảo quản ở nhiệt độ phòng trong vòng 24giờ

Ghi nhận kết quả ở những giếng cuối cùng có xuất hiện ngưng kết, ta kết luận được ở lần pha loãng nào thì cho phản ứng ngưng kết.

Giếng	1	2	3	4	5	6	7	8
Nước muối sinh lý (μl)		25	25	25	25	25	25	25
Huyết thanh (μl)	25	25						
Vi khuẩn (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25
Tổng cộng (μl)	50	50	50	50	50	50	50	50

3.4.8. Phương pháp kiểm tra khả năng miễn cảm với kháng sinh của vi khuẩn

Khả năng miễn cảm kháng sinh của các chủng vi khuẩn *Streptococcus* spp. được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Theo phương pháp của Kirby Bauer) và đánh giá kết quả theo Hội đồng quốc gia Hoa kỳ về các tiêu chuẩn lâm sàng phòng thí nghiệm (National Committee of Clinical Laboratory Standards - NCCLS, 1999).

Vi khuẩn sau khi được giám định thì tiến hành làm kiểm tra khả năng miễn cảm với kháng sinh.

Dùng que cấy tiết trùng lấy khuẩn lạc trên đĩa vi khuẩn cho vào ống nghiệm chứa 10ml nước muối sinh lý (0,85%) đã tiết trùng. Trộn đều và tiến hành xác định mật độ vi khuẩn bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 610 nm và điều chỉnh để xác định mật số vi khuẩn đạt 10^8 cfu/ml ($OD = 0,1 \pm 0,02$).

Sau khi xác định mật số vi khuẩn thì tiến hành lán dung dịch vi khuẩn lên môi trường thạch.

Dùng tăm bông tiết trùng nhúng vào dung dịch vi khuẩn, lán đều trên môi trường thạch BHIA. Sau đó để yên khoảng một phút rồi dùng pank tiết trùng lấy đĩa giấy tẩm thuốc kháng sinh đặt vào đĩa petri sao cho khoảng cách giữa hai tâm của đĩa thuốc kháng sinh khoảng 24mm và khoảng cách giữa tâm đĩa kháng sinh với mép đĩa petri 10-15mm. Mỗi đĩa petri (đường kính 100mm) môi trường đặt tối đa 6

đĩa kháng sinh.

Sau khi hoàn tất việc dán đĩa thuốc kháng sinh, đặt đĩa petri vào tủ ẩm ở điều kiện 30°C. Sau 24 giờ tiến hành đọc kết quả.

Ghi chú:

- Phải lắc đều vi khuẩn và được lặp lại 3 lần.
- Không sử dụng các kháng sinh có trong danh mục hóa chất, kháng sinh cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh Thủy sản (Phụ lục)

Đọc kết quả: đo đường kính vòng vô trùng (mm) dựa vào chuẩn đường kính vòng vô trùng của nhà sản xuất để xác định loại kháng sinh nhạy, trung bình nhạy và kháng. Kết quả đường kính vòng vô trùng của 2 trong 3 lần lặp lại sai khác không đáng kể thì ghi nhận kết quả của 2 lần lặp lại đó hoặc kết quả trung bình của 3 lần lặp đó.

Bảng 3.3. Đánh giá đường kính vòng vô khuẩn chuẩn

Loại KS	Lượng KS (μg)	R (\leq) (mm)	I (mm)	H (\geq) (mm)
Amoxicillin (Ax)	10	13	14 - 16	17
Ampicillin (Am)	10	13	14 - 16	17
Enrofloxacin (En)	30	16	17 - 19	20
Erythromycine (Er)	15	13	14 - 22	23
Kanamycine (Kn)	30	13	14 - 17	18
Streptomycine (Sm)	10	11	12 - 14	15
Rifampin (Rf)	5	16	17 - 19	20
Doxycilline (Dx)	30	10	11 - 13	14
Tetracycline (Te)	30	11	12 - 14	15
Sulfamethoxazol/Trimethoxazol(Bt)	1,25/23,75	10	10 - 15	16

(Nguồn: Oxoid từ NCCLS (1990) M₂A₄ (Oxioid, 1982))

3.4.9. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng chương trình Excel 2003; so sánh sự sai khác giữa các yếu tố bằng phép thử χ^2 với phần mềm Minitab 14.0 và phép thử Fisher Exact Test (phần mềm SAS 9.1).

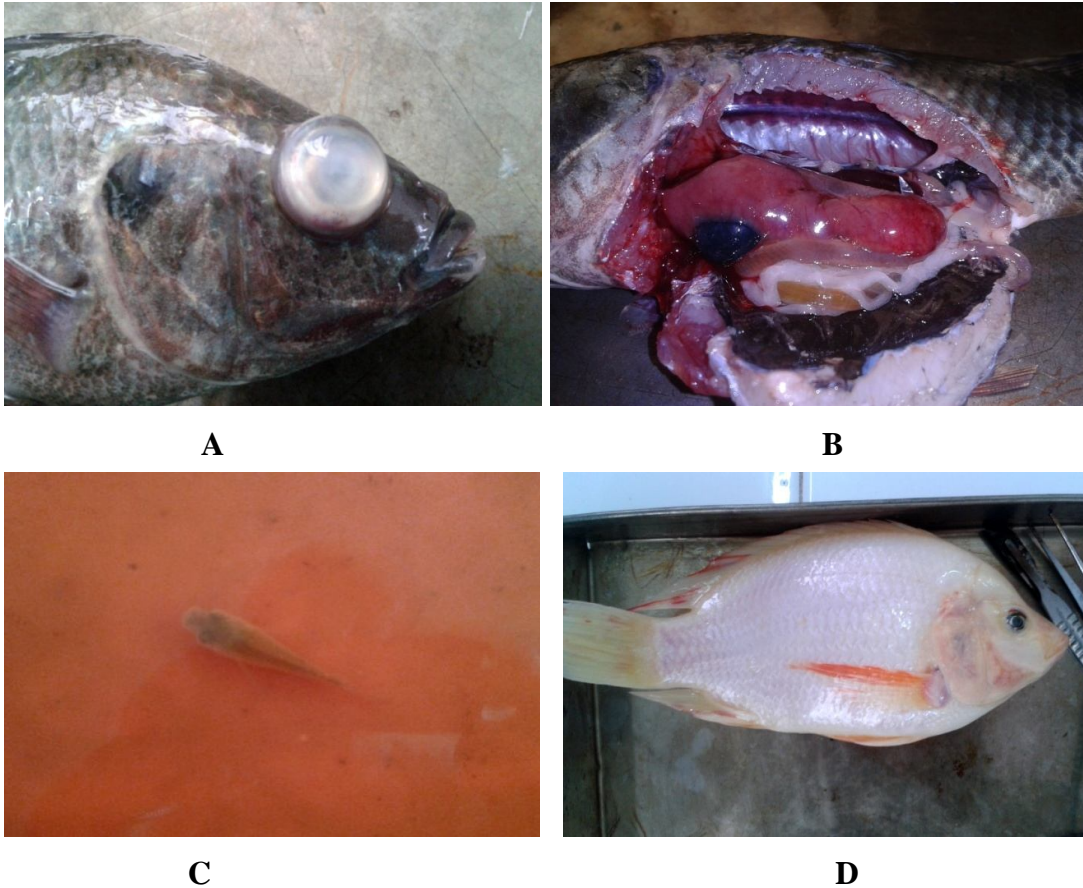
4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

4.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Streptococcus* spp

4.1.1. Kết quả thu mẫu

Tiến hành thu mẫu tại 4 tỉnh = 60 mẫu cá rô phi có biểu hiện bệnh xuất huyết.

Mẫu bệnh phẩm thu từ cá rô phi có biểu hiện bệnh như: cá bệnh bơi lơ dờ, 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, mềm nhũn (Hình 4.1).



Hình 4.1. Dấu hiệu bệnh lý của cá lúc thu mẫu. A: Mắt cá bị lồi, đục. B: Nội tạng cá bị xuất huyết. C: Cá bơi lơ dờ, hoạt động chậm chạp. D: Bụng cá trương to và xuất huyết

Bảng 4.1. Kết quả thu mẫu cá nghi bị bệnh xuất huyết

Giai đoạn	Kích thước (cm)	Trọng lượng cá (gam)	Hình thức nuôi	Số lượng cá thu được (con)
Cá giống	5 ÷ 10	30 ÷ 50	Lồng	10
			Ao	15
Cá thương phẩm	10 ÷ đến xuất bán	≥ 50	Ao	18
			Lồng	17
Tổng số				60

Song song với thu mẫu cá, chúng tôi cũng tiến hành đo các yếu tố môi trường ở ao, lồng nuôi xuất hiện bệnh: nhiệt độ dao động từ 18 – 27⁰C, pH dao động từ 7,5 – 9; hàm lượng oxy hòa tan dao động từ 5 – 10mg/l. Các thông số môi trường trên là thích hợp cho sự tồn tại và phát triển của cá rô phi.

Theo kết quả thu mẫu, chúng tôi nhận thấy những mẫu bệnh thường thu được ở những ao nuôi thả theo hình thức nuôi thâm canh cao, mật độ dày, nước ao bị ô nhiễm nặng, các yếu tố môi trường không thích hợp cho đời sống của cá (DO thấp, hàm lượng NH₃, amoniac cao...). Đây có thể là những yếu tố khiến cho sức đề kháng của cá giảm, nguy cơ mắc bệnh tăng lên.

4.1.2. Kết quả phân lập vi khuẩn

Trước khi tiến hành phân lập, giám định vi khuẩn gây bệnh, chúng tôi đã kiểm tra để loại bỏ những mẫu cá thu được bị bệnh ngoài da do ngoại ký sinh trùng hay nấm. Kết quả cho thấy 100% các mẫu thu được đều sạch bệnh với các tác nhân là ký sinh trùng và nấm.

Tiến hành giải phẫu, mổ khám thu mẫu để kiểm tra vi khuẩn trong các cơ quan nội tạng gồm: gan, thận, não, mắt bằng cách dùng que cấy vô trùng lấy vi khuẩn từ những cơ quan trên ria cấy trên môi trường thạch đĩa BHIA, tìm khuẩn lạc.

Kết quả phân lập vi khuẩn của 60 mẫu cá cho kết quả như trình bày ở bảng 4.2:

Bảng 4.2. Thành phần loài vi khuẩn phân lập được từ mẫu cá bệnh

Địa điểm	Số mẫu	<i>Aeromonas</i> spp.		<i>Pseudomonas</i> spp.		<i>Staphylococcus</i> spp.		<i>Flavobacterium</i> spp.		<i>Streptococcus</i> spp.	
		Mẫu	Tỉ lệ	Mẫu	Tỉ lệ	Mẫu	Tỉ lệ	Mẫu	Tỉ lệ	Mẫu	Tỉ lệ
		(+)	(%)	(+)	(%)	(+)	(%)	(+)	(%)	(+)	(%)
Hà Nội	15	8	53,33	0	0,00	0	0,00	2	13,33	13	87,27
Hải Dương	15	2	13,33	1	6,67	0	0,00	1	6,67	14	93,33
Hải Phòng	15	3	20,00	1	6,67	1	6,67	0	0,00	13	86,67
Quảng Ninh	15	3	20,00	1	6,67	1	6,67	2	13,33	12	80,00
Tổng	60	16	26,67	3	5,00	2	3,33	5	8,33	52	86,67

Ghi chú: (+): số mẫu nhiễm

Khi tiến hành cấy ria để tìm vi khuẩn từ các cơ quan đích là: gan, thận, não, mắt của cá biểu hiện bệnh lý trên môi trường nuôi cấy cơ bản chúng tôi phát hiện thấy khuẩn lạc mọc lên khá thuần (chủ yếu là một loại khuẩn lạc/đĩa môi trường, một số ít đĩa thạch có 2 – 3 loại khuẩn lạc).

Kết quả kiểm tra, trong tổng số 60 mẫu cá rô phi bị bệnh chúng tôi thấy xuất hiện 5 loại vi khuẩn là: *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Flavobacterium* spp. và *Streptococcus* spp.. Trong đó số mẫu tìm thấy *Streptococcus* spp. là cao nhất, có 52/60 chiếm tỉ lệ 86,67%; tiếp đến số mẫu xuất hiện *Aeromonas* spp. có 16/60 chiếm tỉ lệ 26,67%; số mẫu xuất hiện *Pseudomonas* spp. là 5,00%; *Staphylococcus* spp. là 3,33%; sau cùng là số mẫu dương tính với *Flavobacterium* spp. là 8,33%; Sự sai khác này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.

Tại thời điểm thu mẫu thì tỷ lệ chết trung bình phát hiện được vi khuẩn *Streptococcus* spp. thấp nhất là ở Quảng Ninh (80,00%), tiếp đến là mẫu ở Hải Phòng và Hà Nội (86,67%), thấp hơn so với các mẫu thu được ở Hải Dương (93,33%); tuy nhiên, sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi có sự sai khác với nghiên cứu của một số tác giả như: Nguyễn Viết Khuê và cs (2009) thông báo có 74/86 mẫu dương tính với vi khuẩn *Streptococcus* spp. chiếm tỉ lệ 86,05%; Liu và ctv, (2012) cũng chỉ ra tỉ lệ dương tính với vi khuẩn này là 90%;... Sự sai khác này có thể do nguồn mẫu thu được từ các địa phương khác nhau là khác nhau. Các kết quả trên cho thấy vi khuẩn *Streptococcus* spp. xuất hiện nhiều tại các địa phương và ngày càng gây thiệt hại

cho ngành nuôi trồng thủy sản.

Nhằm so sánh tỉ lệ phân lập được *Streptococcus* spp. từ các cơ quan khác nhau của cá bệnh, chúng tôi có kết quả trình bày ở bảng 4.3.

Bảng 4.3. Kết quả phân lập vi khuẩn *Streptococcus* spp. từ các cơ quan của cá rô phi

STT	Cơ quan phân lập	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu nhiễm (+)	Tỷ lệ (%)
1	Gan	52	50	96,15
2	Thận	52	52	100
3	Não	52	52	100
4	Mắt	52	49	94,23

4.2. Kết quả xác định một số đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *Streptococcus* spp. phân lập được.

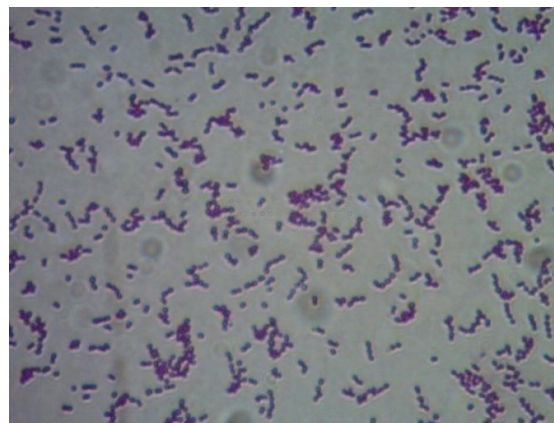
4.2.1. Kết quả xác định một số đặc tính sinh học

Chúng tôi tiến hành giám định đặc tính sinh học của vi khuẩn phân lập được. Kết quả cho thấy: trên môi trường thạch máu, sau 24 giờ nuôi cấy, trên đĩa thạch mọc lên khuẩn lạc màu trắng sữa, tròn, rìa đều, tâm hơi đậm, khuẩn lạc tạo vòng dung huyết beta hoặc gamma nhỏ, trong suốt, rìa không rõ (hình 4.2). Làm tiêu bản nhuộm gram để xem hình thái vi khuẩn, quan sát dưới kính hiển vi vật kính dầu ghi nhận được: vi khuẩn bắt màu tím, gram dương, dạng hình cầu, có thể đứng riêng lẻ, thành từng cặp, và thường xếp với nhau thành chuỗi dài (hình 4.3).

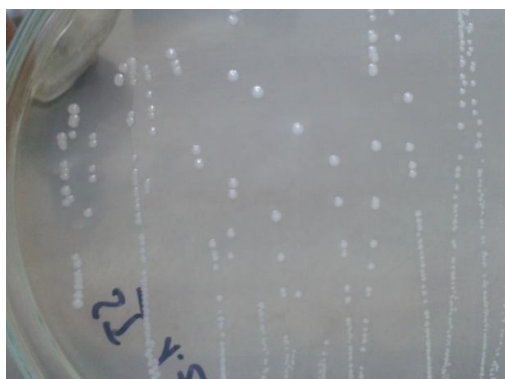
Trên môi trường BHIA (Brain Heart Infusion Agar), nuôi ở nhiệt độ 28 - 30°C trong 24 giờ, chúng tôi xác định được đa số các khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch BHIA đều có hình tròn, rìa đều, bóng, lồi thấp, tâm hơi đậm, đường kính từ 0,5 – 0,7 mm (hình 4.4.).



Hình 4.2 Hình thái khuẩn lạc *Streptococcus* spp. khi nuôi cấy trên môi trường thạch máu



Hình 4.3. Vi khuẩn *Streptococcus* spp.



Hình 4.4. Hình thái khuẩn lạc *Streptococcus* spp. khi nuôi cấy trên môi trường BHIA

4.2.2. Kết quả định danh vi khuẩn

Nhằm mục đích định danh vi khuẩn *Streptococcus* spp. phân lập được, chúng tôi sử dụng bộ kit API 20 Strep của hãng Biomérieux (hình 4.5)



Hình 4.5. Kết quả thử kit API 20Strep định danh *Streptococcus agalactiae*

Kết quả giám định và định danh vi khuẩn bằng kit API 20 Strep được trình bày ở bảng 4.4.

Bảng 4.4. Kết quả giám định và định danh vi khuẩn *Streptococcus* spp.

TT	Chỉ tiêu	Kết quả kiểm tra (<i>n</i> = 52)		
		Đặc tính	Số chủng (+)	Tỷ lệ (+) (%)
1	Nhuộm Gram	Gram (+)	52	100
2	Hình dạng	Cầu khuẩn	52	100
3	Di động	-	52	100
4	Sinh catalaza	-	52	100
5	Sinh oxidaza	-	52	100
6	Phản ứng lên men yếm khí	-	52	100
7	Phản ứng lên men hiếu khí	-	52	100
8	Mọc trên môi trường máu	+	52	100
9	Gây tan huyết	Dạng β	4	7,69
		Dạng γ	48	92,31
10	Phản ứng Voges-Proskauer	+	52	100
11	Hippurate hydrolysis	+	52	100
12	Bile-esculin tolerance	-	52	100
13	Pyrrolidonyl arylamidase	-	52	100
14	Sinh α -galactosidase	-	52	100
15	Sinh β -glucuronidase	-	52	100
16	Sinh β -galactosidase	-	52	100
17	Alkaline phosphatase	+	52	100
18	Leucine AminoPeptidase	+	52	100
19	Arginine Dihydrolase	+	52	100
20	Sử dụng đường			
	Ribose	-	52	100
	Arabinose	-	52	100
	Manitol	-	52	100
	Sorbitol	-	52	100
	Lactose	-	52	100
	Trehalose	+	52	100
	Inulin	-	52	100
	Raffinose	-	52	100
	Amidon	-	52	100
	Glycogen	-	52	100
21	Kiểu huyết thanh	Ib	52	100

(+): dương tính; (-): âm tính

Dựa trên các chỉ tiêu sinh hóa và căn cứ vào mã số định danh của kit API 20 Strep, tất cả 52 chủng vi khuẩn đã phân lập được định danh là *Streptococcus agalactiae*. Kết quả này phù hợp với một số tài liệu trước đó đã mô tả về vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* Buller (2004); Salvador và cs (2005). Đồng Thanh Hà và cs, (2010); Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương (2012) cũng có kết quả tương tự khi kết luận *Streptococcus agalactiae* là tác nhân gây bệnh thu được trên cá rô phi bị bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây ra.

Từ kết quả giám định vi khuẩn học ở trên, chúng tôi đã khẳng định được vai trò quan trọng của *Streptococcus* spp. (đã được định danh loài là *Streptococcus agalactiae*) trong quá trình gây bệnh cho cá tại các tỉnh thuộc địa bàn nghiên cứu. Kết quả này rất có ý nghĩa, phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo với mục đích phòng và trị bệnh; đặc biệt là việc lựa chọn chủng vi khuẩn để sản xuất vacxin phòng bệnh.

4.3. Kết quả xác định độc lực của các chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* phân lập được

4.3.1. Kết quả gây bệnh thực nghiệm của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* ở cá rô phi

Qua kết quả phân lập và định danh vi khuẩn cho thấy cá rô phi bị bệnh bị nhiễm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*, tuy nhiên để kiểm tra xem vi khuẩn này có phải là tác nhân gây bệnh cho cá rô phi hay không chúng tôi đã tiến hành cảm nhiễm gây bệnh bằng 52 chủng vi khuẩn đã phân lập được cho cá rô phi trong phòng thí nghiệm.

Cá được đưa vào gây bệnh hoàn toàn khỏe mạnh, được nuôi thuần hóa 2 ngày trước khi tiến hành cảm nhiễm nhân tạo. Cá được nuôi trong điều kiện các yếu tố thủy lý, thủy hóa thích hợp (Phụ lục 4). Cá gây cảm nhiễm nhân tạo được tiêm canh khuẩn vào xoang bụng, liều tiêm 0,1ml/cá thể (nồng độ vi khuẩn: $10^6 - 10^{10}$ cfu/ml canh thang hay độ pha loãng từ $10^0 - 10^{-5}$). Cá ở lô đối chứng tiêm 0,1ml nước muối sinh lý 0,85%/con.

Kết quả tiến hành cảm nhiễm gây bệnh thực nghiệm bằng chủng vi khuẩn đã phân lập được cho cá rô phi ở những nồng độ khác nhau trong phòng thí nghiệm có

kết quả cụ thể như sau: kết quả sau 24 giờ gây nhiễm cá rô phi đã có biểu hiện bị bệnh với dấu hiệu bệnh lý điển hình là xuất huyết, bị lồi mắt, cá bị nhiễm bệnh chết sau 36 giờ xuất hiện dấu hiệu bệnh lý. Chúng tôi đã phân lập lại được vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* từ các tổ chức gan, thận, não, mắt của cá bị bệnh sau khi cảm nhiễm với những dấu hiệu bệnh lý điển hình. Ở tất cả các liều thử nghiệm đều có cá chết ngoại trừ lô đối chứng và chủng H2 ở liều 10^6 cfu/ml không gây chết cá thí nghiệm. Kết quả gây bệnh thực nghiệm được thể hiện rõ qua các bảng 4.5 – 4.8:

Bảng 4.5. Kết quả gây bệnh thực nghiệm của các chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* thu tại Hải Dương

Chủng vi khuẩn	Số cá thí nghiệm (con)	Tỷ lệ chết trên 50% cá thí nghiệm ở các nồng độ (cfu/ml)				
		10^{10}	10^9	10^8	10^7	10^6
T1	20	-	-	-	-	-
T2	20	+	+	-	-	-
T3	20	+	+	+	+	-
T4	20	-	-	-	-	-
T5	20	+	+	+	+	-
T6	20	-	-	-	-	-
T7	20	-	-	-	-	-
T8	20	-	-	-	-	-
T9	20	+	+	-	-	-
T10	20	+	+	+	+	-
T11	20	+	+	-	-	-
T12	20	+	+	-	-	-
T13	20	+	+	-	-	-
T14	20	+	+	+	+	+
Đối chứng	20	-	-	-	-	-

Bảng 4.6. Kết quả gây bệnh thực nghiệm của các chủng vi khuẩn

Streptococcus agalactiae thu tại Hà Nội

Chủng vi khuẩn	Số cá thí nghiệm (con)	Tỷ lệ chết trên 50% cá thí nghiệm ở các nồng độ (cfu/ml)				
		10^{10}	10^9	10^8	10^7	10^6
C1	20	+	+	-	-	-
C2	20	+	+	+	+	+
C3	20	+	+	+	-	-
C4	20	+	-	-	-	-
C5	20	+	+	-	-	-
C6	20	+	+	-	-	-
C7	20	+	+	+	+	-
C8	20	+	+	-	-	-
C9	20	-	-	-	-	-
C10	20	-	-	-	-	-
C11	20	-	-	-	-	-
C12	20	+	+	-	-	-
C13	20	-	-	-	-	-
Đối chứng	20	-	-	-	-	-

Bảng 4.7. Kết quả gây bệnh thực nghiệm của các chủng vi khuẩn

Streptococcus agalactiae thu tại Hải Phòng

Chủng vi khuẩn	Số cá thí nghiệm (con)	Tỷ lệ chết trên 50% cá thí nghiệm ở các nồng độ (cfu/ml)				
		10^{10}	10^9	10^8	10^7	10^6
H1	20	-	-	-	-	-
H2	20	-	-	-	-	-
H3	20	+	+	+	-	-
H4	20	+	+	-	-	-
H5	20	+	+	+	+	-
H6	20	+	-	-	-	-
H7	20	+	+	+	-	-
H8	20	-	-	-	-	-
H9	20	-	-	-	-	-
H10	20	-	-	-	-	-
H11	20	-	-	-	-	-
H12	20	-	-	-	-	-
H13	20	+	+	-	-	-
Đối chứng	20	-	-	-	-	-

Bảng 4.8. Kết quả gây bệnh thực nghiệm của các chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* thu tại Quảng Ninh

Chủng vi khuẩn	Số cá thí nghiệm (con)	Tỷ lệ chết trên 50% cá thí nghiệm ở các nồng độ (cfu/ml)				
		10^{10}	10^9	10^8	10^7	10^6
V1	20	+	+	-	-	-
V2	20	+	+	-	-	-
V3	20	+	+	+	-	-
V4	20	+	+	+	-	-
V5	20	-	-	-	-	-
V6	20	-	-	-	-	-
V7	20	-	-	-	-	-
V8	20	+	+	-	-	-
V9	20	-	-	-	-	-
V10	20	-	-	-	-	-
V11	20	+	+	-	-	-
V12	20	-	-	-	-	-
Đối chứng	20	-	-	-	-	-

Tỷ lệ gây chết cá thí nghiệm của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* ở nồng độ 10^6 cfu/ml là thấp nhất trung bình dưới 50%,. Ở nồng độ 10^{10} cfu/ml hầu hết gây chết cá thí nghiệm với tỷ lệ rất cao như T3 (100%). Ở nồng độ 10^9 cfu/ml tỷ lệ gây chết cá thí nghiệm trung bình đạt 50%. Các lô đối chứng không có cá chết.

Những cá gần chết hoặc chết sau khi gây bệnh thực nghiệm đều được giải phẫu để kiểm tra, quan sát sự biến đổi bệnh lý của các cơ quan nội tạng bên trong cơ thể. Sau đó lại tiến hành tái phân lập vi khuẩn từ gan, thận, mắt và não 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 giống với khuẩn lạc của vi khuẩn phân lập từ mẫu cá rô phi lúc thu mẫu. Vi khuẩn tái phân lập từ những cá bệnh trong khoảng 24-48 giờ sau khi gây nhiễm được xác định là có các chỉ tiêu hình thái, sinh hóa giống như chủng vi

khuẩn cảm nhiễm *S.agalactiae*. Qua kết quả cảm nhiễm cho thấy vi khuẩn *S.agalactiae* là tác nhân gây bệnh cho cá rô phi nuôi thương phẩm.



Hình 4.6. Cá rô phi có dấu hiệu bệnh lý

sau 24 giờ gây nhiễm với vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

4.3.2. Kết quả tăng cường độc lực của các chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

Mục đích nhằm tuyển chọn được các chủng *Streptococcus agalactiae* có độc lực cao, ổn định về đặc tính để làm bộ giống chuẩn.

Từ kết quả cảm nhiễm vi khuẩn, chúng tôi chọn nồng độ vi khuẩn gây độc lực cho cá thí nghiệm là 10^9 cfu/ml với liều tiêm 0,1ml/1 cá thí nghiệm gây chết 50% cá thí nghiệm. Chúng tôi chọn được 29 chủng vi khuẩn và tiến hành tiếp đời qua cá rô phi (vật chủ chính của vi khuẩn); dùng thí nghiệm sau 3 ngày liên tiếp cá thí nghiệm không chết sau đó tái phân lập lại chủng vi khuẩn và giữ giống để phục vụ nghiên cứu sản xuất kit chẩn đoán và vacxin. Kết quả được trình bày ở bảng 4.9.

Bảng 4.9. Bảng kết quả tăng cường độc lực các chủng vi khuẩn *S.agalactiae*

Kí hiệu chủng	Số cá tiêm (con)	Số lượng cá chết sau các ngày tiêm (con)							Tổng số cá chết (con)	Tỷ lệ chết tích lũy (%)
		1	2	3	4	5	6	7		
T2	20	0	9	4	4	0	0	0	17	85,00
T3	20	0	14	6	0	0	0	0	30	100
T5	20	0	15	3	2	0	0	0	30	100
T9	20	0	12	4	3	0	0	0	19	95,00
T10	20	0	12	3	3	0	0	0	18	90,00
T11	20	0	10	3	3	0	0	1	17	85,00
T12	20	0	8	5	2	1	0	0	16	80,00
T13	20	0	9	6	2	1	1	0	19	95,00
T14	20	0	7	3	3	1	1	0	15	75,00
C1	20	0	12	4	1	1	0	0	18	90,00
C2	20	0	16	3	1	0	0	0	20	100
C3	20	0	10	3	3	2	2	0	20	100
C4	20	0	5	4	4	1	2	0	16	80,00
C5	20	0	1	4	5	2	2	1	15	75,00
C6	20	0	3	3	2	5	1	2	16	80,00
C7	20	0	8	5	3	2	0	1	19	95,00
C8	20	0	7	4	2	2	1	1	16	80,00
C12	20	0	7	8	2	2	0	0	19	95,00
H3	20	0	11	5	3	0	1	0	20	100
H4	20	0	5	5	3	2	1	1	17	85,00
H5	20	0	9	3	3	3	0	0	18	90,00
H7	20	0	12	1	3	3	1	0	20	100
H13	20	0	4	4	3	3	1	1	16	80,00
V1	20	0	1	9	3	3	1	1	18	90,00
V2	20	0	10	7	3	0	0	0	20	100
V3	20	0	5	3	4	3	1	0	16	80,00
V4	20	0	8	5	2	1	0	0	16	80,00
V8	20	0	2	9	3	1	1	1	17	85,00
V11	20	0	6	6	2	2	1	0	17	85,00

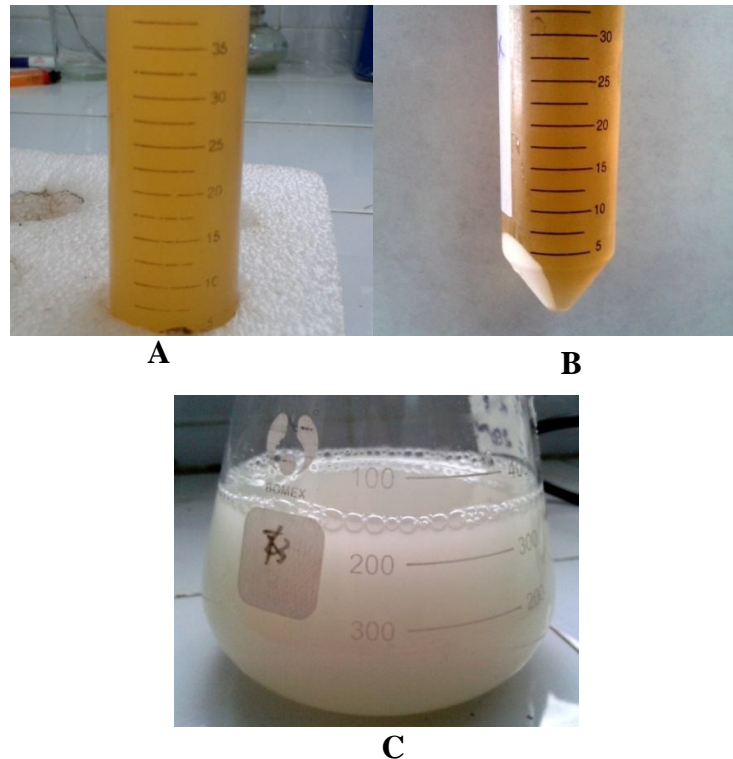
Từ bảng 4.8, sau khi tiến hành công cường độc qua cá rô phi (vật chủ chính của vi khuẩn), chúng tôi xác định được 7 chủng có độc lực cao và ổn định về đặc tính: C2 (100%), C3 (100%), T3 (100%), T5 (100%), V2 (100%), H3 (100%), H7 (100%). Từ kết quả này chúng tôi tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

4.4. Kết quả xác định tính kháng nguyên của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* phân lập được

4.4.4. Kết quả tạo kháng nguyên cho từng chủng vi khuẩn:

Sau khi bất hoạt vi khuẩn bằng formalin 0,5%, chúng tôi tiến hành ly tâm và rửa vi khuẩn (Hình 4.7).

Pha vi khuẩn với nước muối sinh lý với thể tích bằng với thể tích trước khi bất hoạt vi khuẩn ta được hỗn hợp dung dịch và nước muối sinh lý. Bảo quản ở 4⁰C.



Hình 4.7. Vi khuẩn bất hoạt bằng formalin trước ly tâm (A); sau ly tâm (B); pha với nước muối sinh lý (C)

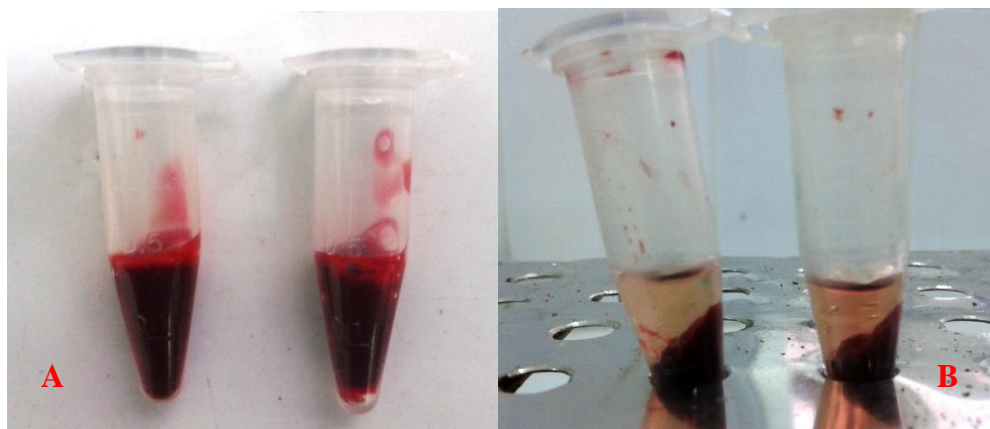
4.4.2. Kết quả tạo kháng thể kháng *S. agalactiae* trên cá rô phi

Sau khi tiêm hỗn hợp dung dịch huyền phù vi khuẩn – nước muối sinh lý vào xoang bụng của cá với liều lượng 0,1ml/cá, cá rô phi không có biểu hiện gì khác thường.

Đến ngày thứ 14 lấy máu cá. Sau khi lấy máu cá đặt nghiêng ống eppendorf để tăng diện tích mặt thoáng và giữ yên trong điều kiện lạnh từ 1-2giờ cho đến khi máu hoàn toàn đông đặc lại.

Dem ly tâm và hút lấy phần huyết thanh có màu vàng nhạt, trong nằm ở phần

trên của ống eppendorf (Hình 4.8).



Hình 4.8. Hình ảnh thu huyết thanh cá

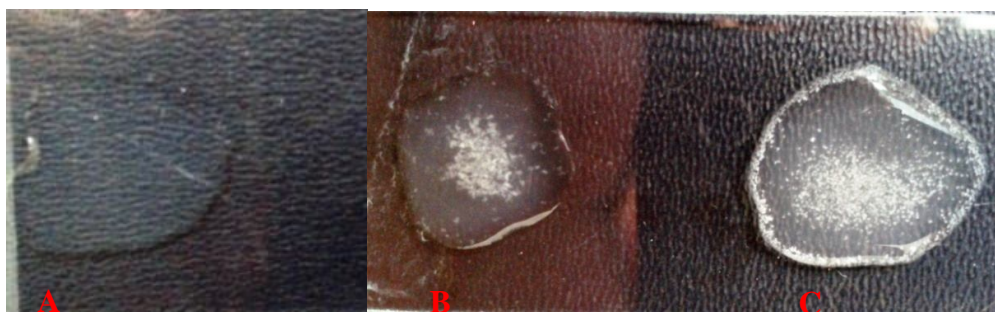
(A): Máu cá; (B): Máu cá sau khi giữ lạnh và ly tâm

4.4.3. Kết quả phản ứng ngưng kết

Với mục đích của đề tài là lựa chọn những chủng vi khuẩn để sản xuất vacxin do đó cần thiết phải lựa chọn những chủng vi khuẩn có sinh đáp ứng miễn dịch và có độc lực cao. Phản ứng ngưng kết dựa trên nguyên tắc của sự liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể có thể nhìn thấy được ở dạng kết khối (Hình 4.9 và 4.10).

Phản ứng dương tính: kháng nguyên bị ngưng kết thành từng đám lấm tấm trên phiến kính, mắt thường nhìn thấy được.

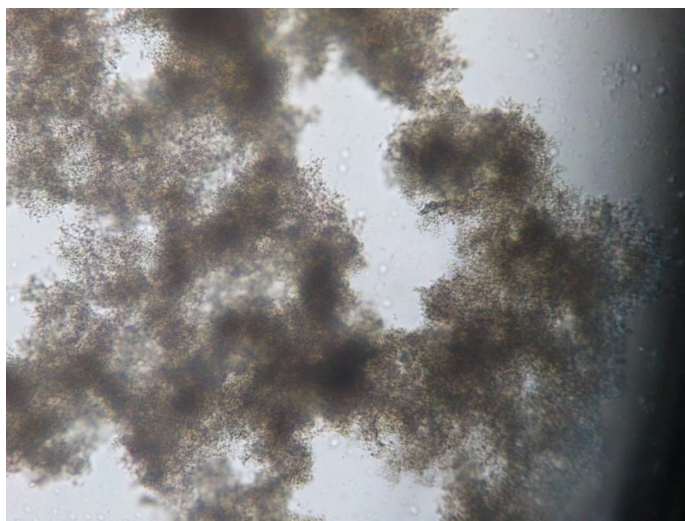
Phản ứng âm tính: Không có hiện tượng ngưng kết, kháng nguyên hòa đều trong hỗn dịch giống như bên đối chứng.



Hình 4.9. Kết quả phản ứng ngưng kết nhanh trên phiến kính

A: Âm tính; B: Dương tính với vi khuẩn sống;

C: Dương tính với vi khuẩn bất hoạt.



Hình 4.10. Hiện tượng ngưng kết quan sát bằng kính hiển vi (40X)

Qua thí nghiệm kiểm tra phản ứng ngưng kết miễn dịch, chúng tôi chọn được 7/7 chủng vi khuẩn độc lực cao có phản ứng ngưng kết. Kết quả trình bày ở bảng 4.10.

Bảng 4.10. Kết quả kiểm tra phản ứng ngưng kết với kháng thể pha loãng

Ngày thu mẫu	Chủng vi khuẩn	Số lần pha loãng kháng thể							
		Vi khuẩn sống				Vi khuẩn bất hoạt			
		0	1/2	1/4	1/8	0	1/2	1/4	1/8
14 ngày	C2	+	+	+	-	+	+	+	-
	C3	+	+	+	-	+	+	+	+
	T3	+	+	+	+	+	+	+	+
	T5	+	+	-	-	+	+	-	-
	H3	+	+	-	-	+	+	-	-
	H7	+	+	+	-	+	+	+	+
	V2	+	+	+	-	+	+	+	-

(-): Kết quả âm tính, phản ứng ngưng kết không xảy ra.

(+): Kết quả dương tính, có xảy ra phản ứng ngưng kết.

3/7 mẫu huyết thanh đã kiểm tra có kháng thể kháng liên cầu khuẩn *S.agalactiae* và cho phản ứng ngưng kết với huyền phù tế bào ở độ pha loãng 8 lần.

Từ bảng kết quả trên, chúng tôi chọn được 7 chủng: C2, C3, T3, T5, H1, H7, V2 làm bộ giống chuẩn để để tiến hành nghiên cứu chế tạo kit và vacxin phục vụ cho chẩn đoán nhanh và phòng. trị bệnh.

4.5. Kết quả kiểm tra khả năng miễn cảm với kháng sinh của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* phân lập được

Mối lo ngại hiện nay đối với y học nói chung và ngành thú y thủy sản nói riêng là tình trạng kháng thuốc của vi khuẩn. Mối lo ngại này còn lớn hơn gấp bội khi vi khuẩn không chỉ đơn kháng với một loại kháng sinh nào đó mà cùng một lúc với nhiều loại kháng sinh. Ngày nay việc sử dụng kháng sinh trong phòng và trị bệnh hay bổ sung trong thức ăn chăn nuôi là rất tùy tiện, không đúng nguyên tắc và dẫn đến hiện tượng kháng thuốc tràn lan. Những chủng vi khuẩn kháng nhiều loại kháng sinh không chỉ lan truyền trong môi trường nuôi thủy sản mà rất dễ dàng lan truyền trong tự nhiên gây hậu quả xấu, gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị và sức khỏe con người cũng như vật nuôi.

Để có cơ sở lựa chọn loại kháng sinh thích hợp sử dụng để điều trị bệnh xuất huyết ở cá rô phi do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) gây ra ở các tỉnh thuộc địa bàn nghiên cứu, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra tính miễn cảm của vi khuẩn với 10 loại kháng sinh đã và đang được sử dụng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản (hình 4.11). Kết quả được trình bày ở bảng 4.11.

Bảng 4.11. Kết quả thử kháng sinh đồ của 52 chủng *S.agalactiae* với 10 loại thuốc kháng sinh thường dùng

STT	Tên thuốc kháng sinh	Kháng thuốc		Miễn cảm trung bình		Miễn cảm cao	
		Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
1	Ampicillin	49	94,23	3	5,77	0	0,00
2	Amoxicillin	52	100	0	0,00	0	0,00
3	Enrofloxacin	0	0,00	0	0,00	52	100
4	Erythromycine	0	0,00	46	88,46	6	11,54
5	Rifampin	52	100	0	0,00	0	0,00
6	Streptomycine	22	42,31	30	57,69	0	0,00
7	Kanamycine	9	17,31	43	82,69	0	0,00
8	Doxycycline	0	0,00	0	0,00	52	100
9	Tetracycline	0	0,00	52	100	0	0,00
10	Sulfamethoxazol/Trimethoxazol	51	98,08	1	1,92	0	0,00

Qua bảng 4.11 cho thấy vi khuẩn *S.agalactiae* phân lập được mẫn cảm với hai loại kháng sinh là Enrofloxacin và Doxycycline. Vì vậy, có thể lựa chọn những thuốc có thành phần hai loại kháng sinh trên để điều trị trong thực tế tại địa bàn nghiên cứu. Tuy nhiên do hiện nay kháng sinh Enrofloxacin thuộc trong nhóm thuốc cấm sử dụng trong nuôi trồng thủy sản nên không nên sử dụng để điều trị trong thực tế.



Hình 4.11. Kiểm tra khả năng mẫn cảm với kháng sinh

5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

Từ các kết quả như đã trình bày ở trên, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Tỷ lệ phân lập được vi khuẩn *Streptococcus* spp. từ các mẫu cá bị bệnh xuất huyết là 86,67%.

- Vi khuẩn *Streptococcus* spp. phân lập được mang đầy đủ các đặc tính sinh học như tài liệu kinh điển đã mô tả. Toàn bộ 52 chủng *Streptococcus* spp. đều được giám định và là *S.agalactiae*.

- Chúng tôi đã chọn được 7 chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*: C2, C3, T3, T5, H3, H7, V2 có độc lực cao, ổn định về đặc tính và có sinh đáp ứng miễn dịch.

- Các chủng vi khuẩn rất mẫn cảm với hai loại kháng sinh là Enzofroxacine và Doxycyline.

Giữ giống phục vụ nghiên cứu sản xuất kit chẩn đoán và vaccine.

5.2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu về tác nhân gây bệnh trên cá rô phi và xây dựng quy trình phòng trị bệnh cho cá rô phi

Từ 7 chủng vi khuẩn thu được, tiếp tục nghiên cứu kit chẩn đoán và vaccin phòng bệnh do vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi tại một số tỉnh miền Bắc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Đồng Thanh Hà, Nguyễn Việt Khuê, Nguyễn Thị Hạnh, (2010). Một số đặc điểm của *Streptococcus agalactiae*, tác nhân gây bệnh Streptococcosis trên cá rô phi ở miền Bắc Việt Nam. Trung tâm nghiên cứu quan trắc cảnh báo môi trường và phòng ngừa dịch bệnh thủy sản miền Bắc – Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy Sản I.
2. Nguyễn Bá Hiên, Trần Thị Lan Hương. Giáo trình miễn dịch học thú y. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
3. Nguyễn Khang (2005). Kháng sinh học ứng dụng, nhà xuất bản y học, Hà Nội.
4. Nguyễn Việt Khuê, Trương Thị Mỹ Hạnh, Đồng Thanh Hà, Nguyễn Thị Hà, Phạm Thành Đô, Bùi Ngọc Thanh, Nguyễn Thị Nguyễn, Nguyễn Hải Xuân, Phạm Thái Giang và Nguyễn Thị Thu Hà, (2009). Xác định nguyên nhân gây chết hàng loạt cá rô phi nuôi thương phẩm tại một số tỉnh miền Bắc. Báo cáo khoa học Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I.
5. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012. Phân lập và xác định đặc điểm của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* từ cá điêu hồng (*Oreochromis sp*) bệnh mù mắt và xuất huyết. Tạp chí khoa học 2012, trường Đại học Cần Thơ, 22c 203-212.
6. Mai Văn Tài (2004), Điều tra đánh giá hiện trạng các loại thuốc, hóa chất và chế phẩm sinh học dùng trong nuôi trồng thủy sản nhằm đề xuất các giải pháp quản lý. Tuyển tập báo cáo khoa học – Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I.
7. Trần Thị Minh Tâm, (2004). Nghiên cứu bệnh nguy hiểm thường gặp trên cá rô phi (*Oreochromis spp*) nuôi thâm canh. Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy Sản II.
8. Bùi Quang Tề, (2006). Bệnh học Thủy sản. Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I.
9. Phạm Anh Tuấn (2006), Báo cáo qui hoạch phát triển cá rô phi giai đoạn 2006-2015.
10. Đinh Thị Thủy, (2007). Nghiên cứu các bệnh nguy hiểm thường gặp ở cá rô phi nuôi thâm canh. Thông tin KHCN & Kinh tế Thủy sản 12.

Tài liệu tiếng Anh

1. Balarin, J.D and R.D. Haller, 1982, The intensive culture of tilapia in tanks, raceways and cages. In: Recent advances in aquaculture (eds. J.F. Muir and R.J. Roberts), pp.266-355. Westview, Boulder.
2. Bromage E. S., Thomas A. and Owens L. (1999) *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. Diseases of Aquatic Organisms, 36: 177-181.
3. Buller, N.B., 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practice identification manual, 361 pp.
4. El-Sayed, Abdel - Fattah M., (2006). Tilapia culture. CABI Publishing. ISBN-13: 978-0-85199-014-9.
5. Evans, J., Klesius, P.H. and Shoemaker, C.A. 2006. Sreptococcus in warm-water fish.

- Aquaculture Health International. 10-14
6. FAO (2004), State of World Fisheries and Aquaculture 2004, FAO, Rome, Italy.
 7. Frerichs, G.N & Millar (1993). Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens. Pisces Press. Stirling, pp. 58
 8. Gupta M.V và Acosta B.O. (2004). Review of global tilapia farming practices. Aquaculture Asia IX, 7 - 12.
 9. Hernandez, E., J. Figueroa and C. Iregui, (2009). Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: A case study. J. Fish Dis., 32: 247-252.
 10. Inglis, V. (2000), “Antibacterial Chemotherapy in Aquaculture”, Review of Practice, Associated Risks and Need for Action, In: Use of Chemicals in Aquaculture in Asia, Arthur J. R; Lavilla-Pitogo C. R. and Subasinghe R. P., 2000, pp. 7-22
 11. Intervet, (2006). Diseases of Tilapia – An Introduction
 12. Klesius P.H, Shoemaker CA, Evans J.J. Efficacy of a single and combined *Streptococcus iniae* isolates vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 2000; 188 (3-4):327-246.
 13. Lauke Labrie, J.N., Cedric Komar and Brian Sheehan, 2007. Bacterial Diseases of Finfish in the South East Asian Region. Intervet.
 14. Liu Liping, Zhang Zongfeng, Zhang Wembo, Francis Murray, David Little. 2012 Tilapia aquaculture in China: Low market prices, other issues challenge as sector seeks sustainability. Global Aquaculture Advocate, Vo 15. Issue 2, March/ April 2012, pp.20-21
 15. Mian, G.F., D.T. Godoy, C.A.G. Lea, Y.T. Yuhara, G.M. Costa and H.C.P. Figueiredo, 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. Vet. Microbiol., 136: 180-183.
 16. Nguyen, H.T., Kanai, K 1999 Selective agars for the isolation of *Streptococcus iniae* from Japanese flounder. *Paralichthys olivaceus*, and its cultural environment. J. Appl. Microbiol. 86, 769-776.
 17. Perera R.P., J.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, 10: 294 – 299.
 18. Philipart J.C.L. Ruwet, (1982), Ecology and Distribution of Tilapia, In: R.S.V. Pullin and R.H. Lowe-Mc Connell (Eds), Biology and Culture of Tilapia, ICLAM conference Proceedings 7,432. ICLARM, Manila, Philippines, pp 15-59.
 19. Phillips Michael (2000), “The use of Chemicals in Carp and Shrimp Aquaculture in Bangladesh, Cambodia, Lao PDR, Nepal, Pakistan, Sri Lanka and Viet Nam”, Use of chemicals in Aquaculture in Asia, pp. 75-85
 20. Plumb, J.A., 1999. Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes. Iowa State University Press, Ames.
 21. Pretto-Giordano, L.G., E.E. Muller, J.C de Fritas and V.G. da Silva, 2010a. Evaluation on the Pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Brazilian Arch. Biol. Technol., 53: 87-92.

22. Salvador, R., E.E. Muller, J.C. Freitas, J.H. Leonhardt, L.G. Pretto-Giordano and J.A. Dias, (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 Prana State, Brazil. *Ciencia Rural*, 35: 1374-1378.
23. Sheehan, (2009). Streptococcosis in Tilapia: A more complex problem. (<http://www.thefishsite.com/articles/812/>)
24. Shoemaker, C.A., Xu, D., Klesius, P.H., Evans, J.J, (2008). Concurrent infections (parasitism and bacterial disease) in tilapia, The 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Cairo, Egypt pp. 1365-1375.
25. Yuasa, Kamaishi, Hatai, Bahnnan and Borisuthpeth, (2005). Two cases of streptococcal infections of cultured tilapia in Asia. In: Sixth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (ed Bondad-Reantaso MG, Mohan, C.V., Crumlish, M. and Subasinghe, R.P.) Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Colombo – Sri Lanka, pp. 259-268.
26. Zamri-Saad M, Amal MN, Siti-Zahrah A.. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus* agalactiae. *Journal of comparative pathology*, 2010 Aug-Oct; 143(2-3): 227-9. doi: 10.1016/j.jcpa. 2010.01.020. Epub 2010 Mar 23.
27. Wongtavatchai & Maisak, (2008). Pathobiological Characteristic of Streptococcosis in Farmed Tilapia, *Oreochromis nilotica*, in Thailand. *Proceedings of 5th world fisheries congress*.

Web tham khảo

<https://apiweb.biomerieux.com>

PHỤ LỤC

Phụ lục 1.

DANH MỤC HOÁ CHẤT, KHÁNG SINH CẤM SỬ DỤNG TRONG SẢN XUẤT, KINH DOANH THỦY SẢN

(Ban hành kèm theo Thông tư số 15/2009/TT-BNN ngày 17 tháng 3 năm 2009

của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn)

TT	Tên hoá chất, kháng sinh	Đối tượng áp dụng
1	Aristolochia spp và các chế phẩm từ chúng	Thức ăn, thuốc thú y, hoá chất, chất xử lý môi trường, chất tẩy rửa khử trùng, chất bảo quản, kem bôi da tay trong tất cả các khâu sản xuất giống, nuôi trồng động thực vật dưới nước và lưỡng cư, dịch vụ nghề cá và bảo quản, chế biến.
2	Chloramphenicol	
3	Chloroform	
4	Chlorpromazine	
5	Colchicine	
6	Dapsone	
7	Dimetridazole	
8	Metronidazole	
9	Nitrofurantoin (bao gồm cả Furazolidone)	
10	Ronidazole	
11	Green Malachite (Xanh Malachite)	
12	Ipronidazole	
13	Các Nitroimidazole khác	
14	Clenbuterol	
15	Diethylstilbestrol (DES)	
16	Glycopeptides	
17	Trichlorfon (Dipterex)	
18	Gentian Violet (Crystal violet)	
19	Nhóm Fluoroquinolones (cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh thuỷ sản xuất khẩu vào thị trường Mỹ và Bắc Mỹ)	

Phụ lục 2
DANH MỤC HOÁ CHẤT, KHÁNG SINH HẠN CHẾ SỬ DỤNG
TRONG SẢN XUẤT KINH DOANH THỦY SẢN
(Ban hành kèm theo Thông tư số 15/2009/TT-BNN ngày 17 tháng 3 năm 2009
của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn)

TT	Tên hoá chất, kháng sinh	Dư lượng tối đa (MRL)(ppb)
1	Amoxicillin	50
2	Ampicillin	50
3	Benzylpenicillin	50
4	Cloxacillin	300
5	Dicloxacillin	300
6	Oxacillin	300
7	Oxolinic Acid	100
8	Colistin	150
9	Cypermethrin	50
10	Deltamethrin	10
11	Diflubenzuron	1000
12	Teflubenzuron	500
13	Emamectin	100
14	Erythromycine	200
15	Tilmicosin	50
16	Tylosin	100
17	Florfenicol	1000
18	Lincomycine	100
19	Neomycine	500
20	Paromomycin	500
21	Spectinomycin	300
22	Chlortetracycline	100
23	Oxytetracycline	100
24	Tetracycline	100
25	Sulfonamide (các loại)	100
26	Trimethoprim	50
27	Ormetoprim	50
28	Tricainemethanesulfonate	15-330
29	Danofloxacin	100
30	Difloxacin	300
31	Enrofloxacin + Ciprofloxacin	100
32	Sarafloxacin	30
33	Flumequine	600

Phụ lục 3: Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá của vi khuẩn phân lập từ cá điều hồng bệnh

Chỉ tiêu	Chủng vi khuẩn											
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
Nhuộm Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hình dạng	Cầu	Cầu	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	β	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	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Kiểu huyết thanh	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib

Chỉ tiêu	Chủng vi khuẩn											
	T13	T14	C2	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Nhuộm Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hình dạng	Cầu	Cầu	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	β	γ	γ	β	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	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Kiểu huyết thanh	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib

Chỉ tiêu	Chủng vi khuẩn											
	C11	C12	C13	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
Nhuộm Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hình dạng	Cầu	Cầu	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	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	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Kiểu huyết thanh	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib

Chỉ tiêu	Chủng vi khuẩn											
	H10	H11	H12	H13	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8
Nhuộm Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hình dạng	Cầu	Cầu	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	β	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	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Kiểu huyết thanh	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib	Ib

Chỉ tiêu	Chủng vi khuẩn				
	V9	V10	V11	V12	Buller (2004)
Nhuộm Gram	+	+	+	+	+
Hình dạng	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	
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	

Ghi chú: (+) dương tính; (-) âm tính; (+s) phản ứng chậm

**Phụ lục 4. Kết quả gây bệnh thực nghiệm của các chủng vi khuẩn
Streptococcus agalactiae thu tại Hải Dương**

Mã lưu	Mật độ VK tiêm (cfu/ml)	Số lượng cá tiêm (con)	Tỷ lệ chết (%)
T1	10 ¹⁰	20	40,00
	10 ⁹	20	40,00
	10 ⁸	20	30,00
	10 ⁷	20	20,00
	10 ⁶	20	20,00
T2	10 ¹⁰	20	60,00
	10 ⁹	20	50,00
	10 ⁸	20	40,00
	10 ⁷	20	40,00
	10 ⁶	20	30,00
T3	10 ¹⁰	20	100,00
	10 ⁹	20	80,00
	10 ⁸	20	70,00
	10 ⁷	20	60,00
	10 ⁶	20	40,00
T4	10 ¹⁰	20	40,00
	10 ⁹	20	40,00
	10 ⁸	20	30,00
	10 ⁷	20	30,00
	10 ⁶	20	20,00
T5	10 ¹⁰	20	80,00
	10 ⁹	20	60,00
	10 ⁸	20	50,00
	10 ⁷	20	50,00
	10 ⁶	20	20,00
T6	10 ¹⁰	20	40,00
	10 ⁹	20	30,00
	10 ⁸	20	20,00
	10 ⁷	20	10,00
	10 ⁶	20	10,00
T7	10 ¹⁰	20	10,00
	10 ⁹	20	10,00
	10 ⁸	20	0
	10 ⁷	20	0

	10^6	20	0
T8	10^{10}	20	40,00
	10^9	20	40,00
	10^8	20	30,00
	10^7	20	10,00
	10^6	20	10,00
T9	10^{10}	20	60,00
	10^9	20	50,00
	10^8	20	30,00
	10^7	20	30,00
	10^6	20	20,00
T10	10^{10}	20	70,00
	10^9	20	70,00
	10^8	20	70,00
	10^7	20	60,00
	10^6	20	40,00
T11	10^{10}	20	70,00
	10^9	20	60,00
	10^8	20	40,00
	10^7	20	40,00
	10^6	20	30,00
T12	10^{10}	20	50,00
	10^9	20	50,00
	10^8	20	30,00
	10^7	20	10,00
	10^6	20	0,00
T13	10^{10}	20	60,00
	10^9	20	50,00
	10^8	20	40,00
	10^7	20	40,00
	10^6	20	20,00
T14	10^{10}	20	70,00
	10^9	20	60,00
	10^8	20	50,00
	10^7	20	50,00
	10^6	20	30,00
Đối chứng	0,85%	20	0

**Phụ lục 5. Kết quả gây bệnh thực nghiệm của các chủng vi khuẩn
Streptococcus agalactiae thu tại Hà Nội**

Mã lưu	Mật độ VK tiêm (cfu/ml)	Số lượng cá tiêm (con)	Tỷ lệ chết (%)
C1	10^{10}	20	60,00
	10^9	20	50,00
	10^8	20	40,00
	10^7	20	40,00
	10^6	20	20,00
C2	10^{10}	20	90,00
	10^9	20	80,00
	10^8	20	60,00
	10^7	20	60,00
	10^6	20	50,00
C3	10^{10}	20	90,00
	10^9	20	70,00
	10^8	20	60,00
	10^7	20	40,00
	10^6	20	40,00
C4	10^{10}	20	50,00
	10^9	20	40,00
	10^8	20	30,00
	10^7	20	10,00
	10^6	20	10,00
C5	10^{10}	20	60,00
	10^9	20	60,00
	10^8	20	40,00
	10^7	20	30,00
	10^6	20	20,00
C6	10^{10}	20	50,00
	10^9	20	50,00
	10^8	20	40,00
	10^7	20	10,00
	10^6	20	10,00
C7	10^{10}	20	70,00
	10^9	20	70,00
	10^8	20	60,00

	10^7	20	50,00
	10^6	20	40,00
C8	10^{10}	20	60,00
	10^9	20	50,00
	10^8	20	30,00
	10^7	20	10,00
	10^6	20	10,00
C9	10^{10}	20	20,00
	10^9	20	20,00
	10^8	20	10,00
	10^7	20	0
	10^6	20	0
C10	10^{10}	20	40,00
	10^9	20	40,00
	10^8	20	20,00
	10^7	20	10,00
	10^6	20	10,00
C11	10^{10}	20	30,00
	10^9	20	20,00
	10^8	20	0
	10^7	20	0
	10^6	20	0
C12	10^{10}	20	50,00
	10^9	20	50,00
	10^8	20	30,00
	10^7	20	10,00
	10^6	20	0
C13	10^{10}	20	10,00
	10^9	20	10,00
	10^8	20	0
	10^7	20	0
	10^6	20	0
Đối chứng	0,85%	20	0

**Phụ lục 6. Kết quả gây bệnh thực nghiệm của các chủng vi khuẩn
Streptococcus agalactiae thu tại Hải Phòng**

Mã lưu	Mật độ VK tiêm (cfu/ml)	Số lượng cá tiêm (con)	Tỷ lệ chết (%)
H1	10^{10}	20	40,00
	10^9	20	30,00
	10^8	20	20,00
	10^7	20	10,00
	10^6	20	10,00
H2	10^{10}	20	0
	10^9	20	0
	10^8	20	0
	10^7	20	0
	10^6	20	0
H3	10^{10}	20	70,00
	10^9	20	60,00
	10^8	20	60,00
	10^7	20	40,00
	10^6	20	40,00
H4	10^{10}	20	60,00
	10^9	20	50,00
	10^8	20	40,00
	10^7	20	20,00
	10^6	20	20,00
H5	10^{10}	20	70,00
	10^9	20	60,00
	10^8	20	50,00
	10^7	20	50,00
	10^6	20	20,00
H6	10^{10}	20	50,00
	10^9	20	40,00
	10^8	20	20,00
	10^7	20	20,00
	10^6	20	0
H7	10^{10}	20	70,00
	10^9	20	70,00
	10^8	20	50,00

	10^7	20	30,00
	10^6	20	20,00
H8	10^{10}	20	40,00
	10^9	20	20,00
	10^8	20	10,00
	10^7	20	10,00
	10^6	20	0
H9	10^{10}	20	40,00
	10^9	20	30,00
	10^8	20	10,00
	10^7	20	0
	10^6	20	0
H10	10^{10}	20	10,00
	10^9	20	10,00
	10^8	20	0
	10^7	20	0
	10^6	20	0
H11	10^{10}	20	40,00
	10^9	20	40,00
	10^8	20	30,00
	10^7	20	20,00
	10^6	20	20,00
H12	10^{10}	20	30,00
	10^9	20	20,00
	10^8	20	20,00
	10^7	20	10,00
	10^6	20	0
H13	10^{10}	20	60,00
	10^9	20	50,00
	10^8	20	40,00
	10^7	20	40,00
	10^6	20	20,00
Đối chứng	0,85%	20	0

**Phụ lục 7. Kết quả gây bệnh thực nghiệm của các chủng vi khuẩn
Streptococcus agalactiae thu tại Quảng Ninh**

Mã lưu	Mật độ VK tiêm (cfu/ml)	Số lượng cá tiêm (con)	Tỷ lệ chết (%)
V1	10^{10}	20	60,00
	10^9	20	50,00
	10^8	20	40,00
	10^7	20	20,00
	10^6	20	20,00
V2	10^{10}	20	70,00
	10^9	20	60,00
	10^8	20	40,00
	10^7	20	30,00
	10^6	20	20,00
V3	10^{10}	20	60,00
	10^9	20	50,00
	10^8	20	50,00
	10^7	20	30,00
	10^6	20	10,00
V4	10^{10}	20	70,00
	10^9	20	60,00
	10^8	20	50,00
	10^7	20	30,00
	10^6	20	20,00
V5	10^{10}	20	40,00
	10^9	20	40,00
	10^8	20	30,00
	10^7	20	10,00
	10^6	20	10,00
V6	10^{10}	20	40,00
	10^9	20	30,00
	10^8	20	20,00
	10^7	20	10,00
	10^6	20	10,00
V7	10^{10}	20	10,00
	10^9	20	10,00
	10^8	20	0

	10^7	20	0
	10^6	20	0
V8	10^{10}	20	50,00
	10^9	20	50,00
	10^8	20	40,00
	10^7	20	20,00
	10^6	20	10,00
V9	10^{10}	20	40,00
	10^9	20	30,00
	10^8	20	10,00
	10^7	20	0
	10^6	20	0
V10	10^{10}	20	20,00
	10^9	20	20,00
	10^8	20	10,00
	10^7	20	0
	10^6	20	0
V11	10^{10}	20	50,00
	10^9	20	50,00
	10^8	20	30,00
	10^7	20	20,00
	10^6	20	20,00
V12	10^{10}	20	10,00
	10^9	20	10,00
	10^8	20	0
	10^7	20	0
	10^6	20	0
Đối chứng	0,85%	20	0

Phụ lục 8: Điều kiện môi trường trong quá trình gây bệnh thực nghiệm

STT	Các yếu tố môi trường	Độ biến động
1	Nhiệt độ	$26 \div 33^{\circ}\text{C}$
2	O_2	$4 \div 6 \text{ (mg/l)}$
3	pH	$7 \div 8$
4	$\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$	$0,007 \div 0,009 \text{ (mg/l)}$
5	Kiểm	$102 \div 120 \text{ (mg CaCO}_3\text{/l)}$

Phụ lục 9: Đường kính vòng vô khuẩn của 52 chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* với 10 loại thuốc kháng sinh thường dùng

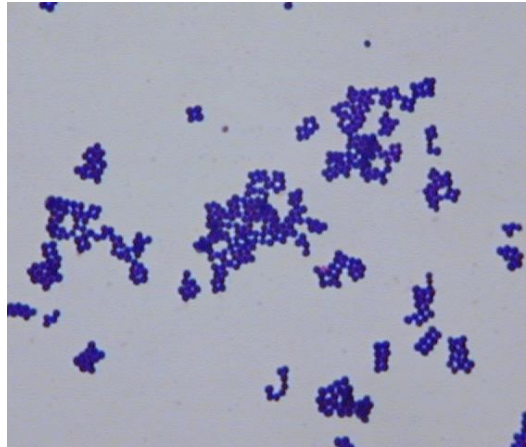
	Ax	Am	En	Er	Kn	Sm	Rf	Dx	Te	Bt
T1	13,0	11,1	29,0	21,0	15,0	14,4	12,7	21,4	15,8	15,4
T2	12,3	12,0	29,7	21,5	15,1	17,0	14,3	24,3	17,2	13,3
T3	13,7	11,4	29,6	20,8	16,3	16,3	16,0	27,6	15,8	16,2
T4	12,6	11,6	29,8	23,1	14,2	16,4	16,4	21,0	16,4	14,3
T5	13,5	11,6	27,3	22,0	15,5	16,1	13,0	25,8	15,1	13,7
T6	14,0	13,1	25,0	20,7	14,0	15,5	15,6	25,3	17,4	14,1
T7	11,8	12,0	29,5	21,4	14,7	15,9	15,7	24,1	15,6	14,0
T8	12,3	11,3	29,3	21,6	14,9	14,7	15,0	22,0	15,9	15,4
T9	12,3	11,4	24,9	23,4	15,1	16,0	14,9	26,7	17,0	14,9
T10	12,5	11,3	25,5	22,0	16,0	16,0	14,2	27,3	16,5	15,2
T11	13,0	11,9	26,0	22,4	13,9	15,2	14,9	27,0	16,1	15,0
T12	14,2	11,8	26,0	20,9	14,5	15,8	14,3	27,4	16,0	15,6
T13	13,5	11,8	28,4	20,0	14,3	15,3	12,9	27,1	17,9	13,1
T14	12,5	13,0	24,3	22,1	15,0	14,6	12,9	26,8	15,9	14,0
C1	12,4	12,3	27,8	20,1	15,8	14,9	13,0	26,8	15,5	14,9
C2	12,9	12,1	26,9	20,5	15,4	16,0	15,7	25,0	16,2	14,3
C3	13,5	12,3	28,0	20,5	15,0	17,2	16,2	24,3	15,4	14,8
C4	13,3	11,8	27,6	21,0	14,3	13,6	15,6	23,1	15,6	13,5
C5	13,3	11,7	25,3	22,2	14,0	14,5	15,0	21,0	16,3	13,5
C6	13,0	11,5	27,3	22,8	16,0	14,0	15,3	21,9	16,5	14,0
C7	13,1	11,9	27,0	21,3	16,4	13,7	15,8	25,3	16,5	14,7
C8	12,9	11,9	26,7	21,3	16,4	13,0	15,0	24,3	17,1	14,3
C9	12,9	11,7	28,4	22,1	15,1	16,1	14,5	24,9	17,4	14,4
C10	13,0	11,6	25,8	22,5	15,2	17,3	15,5	27,1	17,5	14,8
C11	13,0	11,4	26,0	22,8	15,2	13,9	16,0	21,6	16,0	14,8
C12	13,2	11,1	27,8	22,4	14,9	14,5	14,3	22,9	16,4	14,9

C13	13,2	11,5	26,0	22,4	14,8	14,0	16,4	24,4	16,2	15,3
H1	13,6	11,6	25,2	20,3	14,0	13,6	15,3	24,0	17,0	15,1
H2	13,5	11,6	29,1	20,8	13,4	14,8	14,2	23,2	15,4	13,7
H3	13,0	12,0	27,1	23,0	15,0	17,0	15,9	23,9	15,9	14,3
H4	13,5	12,0	28,4	21,0	15,7	16,5	15,9	21,8	15,7	14,2
H5	13,0	12,3	27,3	22,9	14,6	16,1	16,3	21,7	15,9	13,7
H6	12,7	11,3	26,8	21,3	14,1	13,9	16,6	25,2	16,4	14,4
H7	12,8	11,5	25,6	21,3	16,2	15,5	16,6	26,3	16,0	15,5
H8	13,0	11,7	28,5	20,1	16,0	16,1	17,0	26,0	17,2	15,0
H9	13,4	11,5	26,5	20,4	14,2	17,1	13,4	25,1	15,3	15,0
H10	13,3	11,5	28,0	21,0	15,0	14,0	15,2	24,3	15,8	14,4
H11	14,1	12,0	27,9	22,7	13,9	13,2	15,8	25,0	15,7	14,5
H12	12,4	11,9	26,8	23,1	13,9	14,7	15,0	21,9	16,4	14,9
H13	12,4	11,9	26,8	23,0	14,1	13,0	13,2	26,2	15,7	14,2
H14	12,8	11,2	27,7	21,9	14,2	15,1	15,8	22,0	16,0	14,8
V1	13,0	11,6	25,9	22,0	14,2	16,1	16,3	21,1	16,8	14,1
V2	13,5	11,7	26,3	20,2	15,3	15,4	12,9	24,5	16,3	13,8
V3	13,0	11,8	25,9	20,5	15,1	14,0	14,4	22,3	17,1	15,2
V4	12,5	12,0	26,7	20,9	13,7	16,2	15,1	25,9	17,0	15,0
V5	12,7	12,3	26,7	20,1	15,8	15,7	16,4	21,7	15,0	15,4
V6	12,9	12,1	28,1	23,0	15,0	13,5	15,3	24,8	16,3	14,8
V7	13,1	12,0	28,5	21,0	16,0	14,3	15,7	24,5	16,5	14,3
V8	13,0	11,7	28,9	21,8	13,5	17,0	13,7	24,5	16,9	14,2
V9	12,5	11,9	27,2	22,1	14,0	16,1	14,3	21,6	15,5	14,0
V10	12,7	11,8	26,0	20,9	14,9	15,2	14,0	21,1	15,8	15,2
V11	13,1	11,3	26,0	20,4	15,5	15,9	15,4	25,0	15,6	14,6

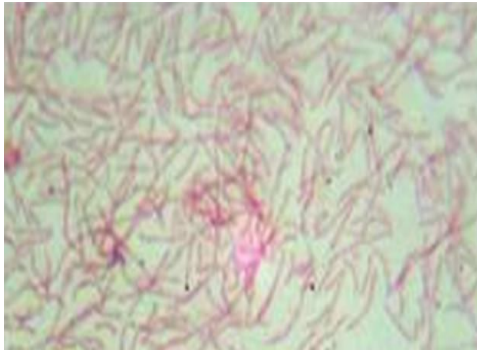
Phụ lục 10: Hình ảnh 4 loại vi khuẩn khác phân lập được



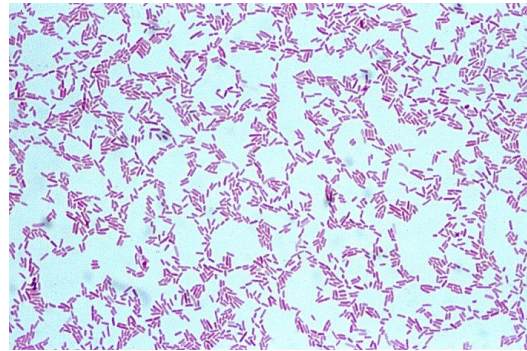
Aeromonas spp.



Staphylococcus spp.



Flavobacterium spp.



Pseudomonas spp.

Phụ lục 11: Một số hình ảnh trong quá trình thực hiện đề tài
Địa điểm thu mẫu cá



Ao nuôi



Lồng nuôi

Tiến hành thí nghiệm



Bể thí nghiệm

Gây bệnh thực nghiệm

Lấy máu cá