

THE VIRULENCE OF 015-RIA1 *Streptococcus agalactiae* ON NILE TILAPIA OF 2nd GENERATION GROWTH PERFORMANCE SELECTION

Pham Hong Nhat^{1*}, Vu Thi Huyen¹, Truong Thi My Hanh¹,
 Nguyen Thi Hanh¹, Ngo Phu Thoa², Pham Anh Tuan³, Phan Thi Van¹

¹Research Institute for Aquaculture No.1 (RIA1), ²Vietnam National University of Agriculture (VNUA),

³Vietnam Fisheries Society (VINAFIS)

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 10/7/2023 Revised: 30/8/2023 Published: 13/9/2023	This study was carried out to determine the <i>Streptococcus agalactiae</i> 015-RIA1 virulence on Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) of 2nd generation growth performance selection. The virulence of bacteria was assessed through the Serotype, virulence genes, and the lethal dose of 50% (LD₅₀). The results showed that the 015-RIA1 strain characterized as serotype Ia, contained 12 virulence genes belonging to 3 clusters involved in the process of adhesions, invasions, and immune evasions. This proves that 015-RIA1 strain is as virulence strain. The LD₅₀ value was 2,2 x 10⁶ cfu/ml after 21 days of infection challenge. After 18 hours of infection, mortality started and infected fish indicated clinical signs such as lethargy, hemorrhage on the skin and base of fins, exophthalmos (eye protrusion), and cloudy eyes. Bacterial isolation from infected fish samples after infection was caused by <i>S. agalactiae</i>. The highest cumulative mortality rate was 71.67% after 8 days of infection challenge. Meanwhile, in the control group, uninfected fish showing no clinical signs, no death, and no <i>S. agalactiae</i> was isolated. These results will be applied to develop molecular markers' relationship with disease resistance in Nile tilapia of growth performance selection.
KEYWORDS Tilapia Virulent genes Serotype LD₅₀ <i>Streptococcus agalactiae</i>	

NGHIÊN CỨU ĐỘC LỰC CỦA VI KHUẨN *Streptococcus agalactiae* 015-RIA1 TRÊN CÁ RÔ PHI VẦN CHỌN GIỐNG SINH TRƯỞNG NHANH THỂ HỆ G2

Phạm Hồng Nhật^{1*}, Vũ Thị Huyền¹, Trương Thị Mỹ Hạnh¹,
 Nguyễn Thị Hạnh¹, Ngô Phú Thoa², Phạm Anh Tuấn³, Phan Thị Vân¹

¹Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản I, ²Học viện Nông nghiệp Việt Nam, ³Hội Nghề cá Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 10/7/2023 Ngày hoàn thiện: 30/8/2023 Ngày đăng: 13/9/2023	Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định độc lực của vi khuẩn <i>S. agalactiae</i> 015-RIA1 trên cá rô phi vằn (<i>Oreochromis niloticus</i>) chọn giống sinh trưởng nhanh thể hệ thứ 2. Độc lực của vi khuẩn được đánh giá thông qua kiểu huyết thanh, gen độc lực và giá trị LD₅₀. Kết quả cho thấy, chủng 015-RIA1 đặc trưng bởi kiểu huyết thanh Ia, mang 12 gen độc lực khác nhau thuộc nhóm gen liên quan đến quá trình bám dính, xâm nhập và xâm nhiễm hệ miễn dịch. Điều này chứng tỏ 015-RIA1 là chủng mang độc lực. Giá trị LD₅₀ của chủng 015-RIA1 là 2,2 x 10⁶ cfu/ml sau 21 ngày cảm nhiễm. Sau 18h cảm nhiễm, cá thí nghiệm bắt đầu chết và xuất hiện dấu hiệu bệnh lý như bơi không định hướng, xuất huyết trên da và gốc vây, mắt bị lồi hoặc mờ đục. Phân lập lại vi khuẩn từ các mẫu cá nhiễm bệnh sau cảm nhiễm đều do vi khuẩn <i>S. agalactiae</i>. Tỷ lệ chết tích lũy cao nhất là 71,67% sau 8 ngày cảm nhiễm. Trong khi đó, ở các bể đối chứng, cá không xuất hiện dấu hiệu bệnh lý, không bị chết và không phân lập được vi khuẩn <i>S. agalactiae</i>. Kết quả này sẽ được ứng dụng để phát triển chỉ thị phân tử liên quan đến khả năng kháng bệnh trên cá rô phi vằn chọn giống sinh trưởng nhanh.
TỪ KHÓA Cá rô phi Gen độc lực Kiểu huyết thanh Liều gây chết 50% <i>Streptococcus agalactiae</i>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8299>

* Corresponding author. Email: hongnhat@ria1.org

1. Mở đầu

Cá rô phi là đối tượng nước ngọt quan trọng thứ 3 trên thế giới cũng như ở Việt Nam [1], [2]. Trong những năm gần đây, dịch bệnh đang là mối đe dọa hàng đầu cho nghề nuôi cá rô phi trên toàn thế giới. Một trong số đó là bệnh xuất huyết do nhóm liên cầu khuẩn (*Streptococcosis*) gây ra [3], [4]. Ở Việt Nam, năm 2009, dịch bệnh gây chết hàng loạt cá rô phi thương phẩm ở một số tỉnh miền Bắc, với tỷ lệ chết lên đến 86-100% và *S. agalactiae* (Group B *Streptococcus* -GBS) được coi là tác nhân gây bệnh chính. Dịch bệnh sau đó xuất hiện hàng năm, khi nhiệt độ ao nuôi cao và chất lượng nước kém [5].

Độc lực của GBS được đánh giá dựa trên kiểu huyết thanh, các gen độc lực và liều gây chết 50% (LD₅₀) sau khi cảm nhiễm gây bệnh cho cá [6]-[8]. Đối với vi khuẩn GBS, độc lực của vi khuẩn được đánh giá thông qua việc xác định 14 gen độc lực chính; bao gồm nhóm gen độc lực liên quan đến quá trình bám dính (*fbsA*, *fbsB*, *pavA*, *lmb* và *scpB*), xâm nhập (*cylE*, *cfb*, *spb1*, *hylB*, *rib* và *bca*) và xâm nhiễm hệ miễn dịch (*bac*, *scpB*, *cspA*, và *pbp1A/ponA*) [9], [10]. Nhiều nghiên cứu đều cho thấy, các đợt dịch bệnh trên cá rô phi liên quan đến các chủng GBS mang kiểu huyết thanh Ia và III; 100% chủng mang kiểu huyết thanh Ia gây bệnh trên cá rô phi ở Trung Quốc và Đài Loan; ở Philippine 83% chủng mang kiểu huyết thanh Ia, 17% là Ib; ở Brazil 95% chủng mang kiểu huyết thanh ST283/III, 5% chủng mang kiểu huyết thanh ST260/Ib; ở Thái Lan 56% chủng mang kiểu huyết thanh III, 44% chủng mang kiểu huyết thanh Ia [7], [8], [11]-[13].

Mức độ độc lực của vi khuẩn cũng được đánh giá qua thí nghiệm cảm nhiễm xác định liều gây chết LD₅₀ trên cá, tuy nhiên kết quả cảm nhiễm có sự khác biệt rất lớn giữa các chủng vi khuẩn, trên từng loài cá rô phi khác nhau. Kết quả xác định giá trị LD₅₀ của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* Ia và III trên cá rô phi vẫn tương ứng là $1,58 \times 10^6$ cfu/cá và $2,10 \times 10^8$ cfu/cá [14]. Ngược lại, Syuhada và cộng sự (2020) [13] ghi nhận kết quả LD₅₀ của chủng ST7/Ia và ST283/III trên cá rô phi đỏ tương ứng là $8,7 \times 10^3$ cfu/ml và $6,3 \times 10^3$ cfu/ml, với mức độ độc lực của chủng ST283 ít nhiều cao hơn so với chủng ST7.

Chính vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm xác định độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1 qua xác định kiểu huyết thanh, gen độc lực và liều gây chết LD₅₀, phục vụ chọn giống cá rô phi kháng bệnh.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cá thí nghiệm: Cá rô phi vẫn chọn giống sinh trưởng nhanh, thể hệ G2, khối lượng 25-30 g/con, từ Trung tâm chọn giống cá rô phi, Quảng Nam (TILACEN), RIA.1. Cá thí nghiệm được nuôi thuần dưỡng 5-7 ngày trong bể xi măng 1 m³. Hàng ngày duy trì chế độ sục khí trong bể nuôi. Cho ăn thức ăn công nghiệp Cargil 35%P, 2 lần/ngày.

Trước khi thí nghiệm kiểm tra ngẫu nhiên 3 cá thể/bể có âm tính với vi khuẩn GBS gây bệnh bằng phương pháp Nested PCR [15] trên máy PCR Mastercycler (Đức). Thành phần phản ứng bao gồm: 7,5 µl Mastermix 2X (Bioline, Mỹ); 0,6 µl mỗi 10µM mỗi loại; 1 µl DNA khuôn và H₂O để ion, với tổng thể tích 15 µl. Chu trình nhiệt như sau: 94°C trong 3 phút; sau đó là 30 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 58°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây); cuối cùng ở 72°C trong 3 phút (PCR1). Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR2 tương tự như phản ứng PCR1.

Chuẩn bị vi khuẩn *S. agalactiae*: Vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1 sử dụng trong nghiên cứu được phân lập tại Hà Tĩnh năm 2016, được đăng ký trên ngân hàng Genbank (NCBI) với mã số là OK047709.1. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường dinh dưỡng (Nutrient broth - NB, Merck) ở 30°C. Sau 24 giờ, tiến hành ly tâm (7.000 vòng/phút trong 5 phút) dịch nuôi cấy, thu dịch lọc vi khuẩn. Xác định mật độ vi khuẩn bằng máy đo quang phổ (bước sóng 600 nm) và phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường chọn lọc Chromagar Strep B (Melab, Việt Nam).

Tách chiết DNA của chủng 015-RIA1: DNA được tách chiết từ dịch lọc vi khuẩn (mật độ 10^8 cfu/ml) bằng kit Exgene tissue SV (GeneAll, Hàn Quốc), theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định kiểu huyết thanh và gen độc lực của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1

Xác định kiểu huyết thanh của vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1

Kiểu huyết thanh của vi khuẩn được xác định bằng phản ứng multiplex-PCR khuếch đại 4 gen *cps* (*cpsL*, *cpsG*, *cpsJ*, *cpsI*) như nghiên cứu của Imperi cùng cộng sự (2010) và Phạm Hồng Nhật cùng cộng sự (2022) [16], [17]. Kết quả được xác định bằng điện di trên gel agarose 2%, với sự xuất hiện của nhiều băng (2-3 băng) trên cùng một sản phẩm PCR, tùy vào kiểu serotype khác nhau (như bảng 1).

Bảng 1. Năm kiểu huyết thanh phổ biến gây bệnh trên cá rô phi

Gen <i>cps</i>	Kích thước	Ia	Ib	III	IV	IX
<i>cpsL</i>	688 bp	+	+	+	+	+
<i>cpsJ</i>	621 bp		+			
<i>cpsJ</i>	538bp				+	
<i>cpsG</i>	352 bp			+		
<i>cpsG</i>	272 bp	+	+		+	+
<i>cpsI</i>	229 bp					+

Xác định gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1

Xác định kiểu huyết thanh của vi khuẩn bằng phản ứng multiplex-PCR khuếch đại 14 gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* với tổ hợp của 3 multiplex cũng như thành phần phản ứng và chu trình nhiệt của phản ứng như nghiên cứu của Phạm Hồng Nhật và cộng sự (2022) [17]. Sản phẩm PCR được kiểm tra như nội dung xác định kiểu huyết thanh, với sự xuất hiện của 4-5 băng trên cùng một sản phẩm PCR, tùy thuộc vào tổ hợp multiplex (như bảng 2).

Bảng 2. Mười bốn gen độc lực chính của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

Gen độc lực của vi khuẩn <i>Streptococcus agalactiae</i>													
Multiplex 1					Multiplex 2					Multiplex 3			
<i>fbxB</i>	<i>bac</i>	<i>cfb</i>	<i>cyIE</i>	<i>fbxA</i>	<i>pbp1A/ponA</i>	<i>pavA</i>	<i>bca</i>	<i>hyIB</i>	<i>lmb</i>	<i>cspA</i>	<i>spb1</i>	<i>rib</i>	<i>scpB</i>

2.2.2. Xác định liều gây chết 50% (LD_{50}) của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1

Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp Reed and Muench (1938) [18], trong các bể xi măng ($1m^3$), số lượng 20 con/bể. Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức tương ứng nồng độ vi khuẩn cảm nhiễm: 10^4 ; 10^5 ; 10^6 và 10^7 cfu/ml. Thí nghiệm cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm với liều tiêm 0,1 ml dịch lọc vi khuẩn/cá thể. Ở nghiệm thức đối chứng, cá được tiêm 0,1 ml nước muối sinh lý. Mỗi nghiệm thức có 3 lần lặp. Thí nghiệm được tiến hành trong thời gian 21 ngày, kiểm tra cá 4 lần/ngày để theo dõi số lượng cá chết (hình 1). Trong quá trình thí nghiệm duy trì chế độ sục khí.

Phân lập và xác nhận lại vi khuẩn *S. agalactiae*

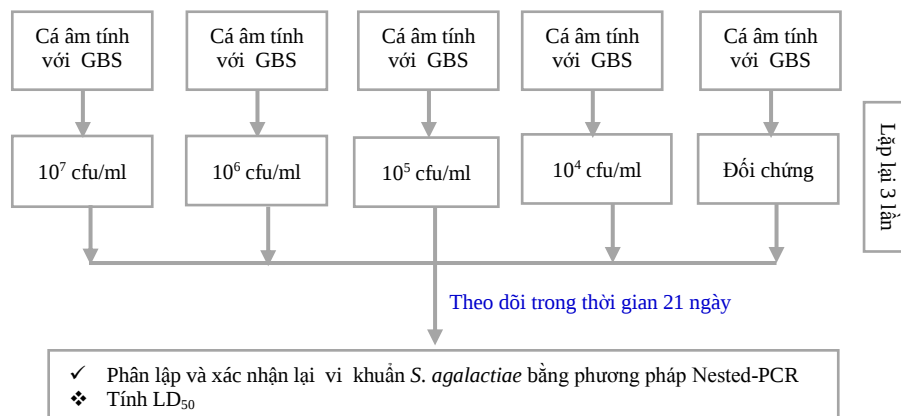
Cá chết sau khi gây cảm nhiễm được phân lập lại bằng nuôi cấy và định danh bằng phương pháp sinh học phân tử. Mẫu mô gan, thận, lách, não của cá nhiễm bệnh được cấy rìa trên môi trường TSA bổ sung thêm 1,5% NaCl và giữ ở 28°C trong 24h. Hình dạng vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi sau nhuộm gram. Mẫu vi khuẩn cũng được giám định theo phương pháp Nested PCR bằng khuếch đại vùng gen 16S-23S rRNA đặc hiệu cho vi khuẩn *S. agalactiae* [17].

Xác định liều gây chết 50% (LD_{50} – Lethal dose 50)

Dựa vào số lượng cá chết ở các nghiệm thức để tính giá trị LD_{50} theo công thức 1:

$$LD_{50} = 10^{a-x} \quad (1)$$

Trong đó: - a: Số lỵ thừa mà tại đó vi khuẩn gây chết cá thấp nhất (trên 50%)
 - x: Được tính dựa vào công thức: $x = (Pa - 50)/(Pa - Pu)$
 - Pa là tỉ lệ cận trên và Pu là tỷ lệ cận dưới của nồng độ gây chết 50%.

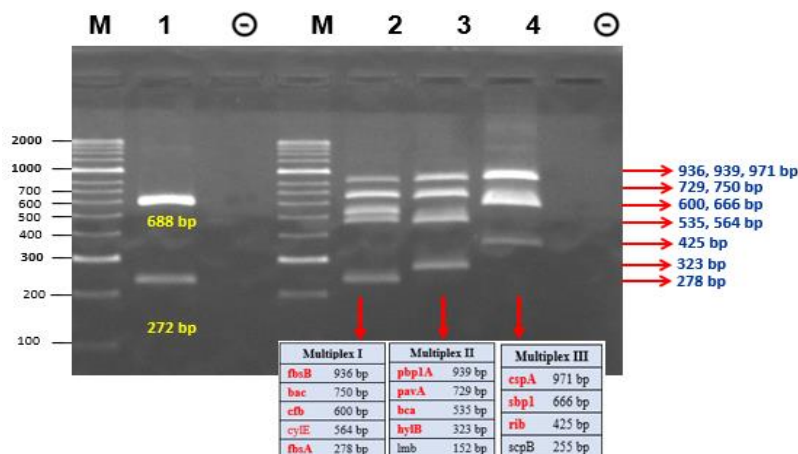


Hình 1. Sơ đồ thí nghiệm xác định liều gây chết LD_{50} của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Kiểu huyết thanh và gen độc lực của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1

Kết quả kiểu huyết thanh và gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1 được trình bày qua hình 2.



Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm Multiplex-PCR xác định kiểu huyết thanh và gen độc lực của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1

Giếng 1: Sản phẩm Multiplex-PCR kiểu huyết thanh; Giếng 2,3,4: Sản phẩm Multiplex-PCR gen độc lực của chủng 015-RIA1; Giếng (-): Mẫu ĐC âm; M: Ladder 50bp

Kết quả điện di sản phẩm Multiplex-PCR ở hình 2 (giếng 1) cho thấy xuất hiện 2 vạch băng sáng rõ tương ứng với 2 gen *cpsL* (~ 700bp) và *cpsG* (~ 250bp). Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn 015-RIA1 mang kiểu huyết thanh Ia. Đây là kiểu huyết thanh của chủng vi khuẩn gây bệnh xuất huyết chủ yếu trên cá rô phi nuôi; như ở Trung Quốc, Đài Loan là 100%, Philippine là 83%, Thái Lan là 44% [7], [8], [11]-[13]. Trong đó, chủng vi khuẩn ST7/Ia gây ra các đợt dịch bệnh lớn trên cá rô phi nuôi ở Trung Quốc năm 2009-2010, đây là chủng vi khuẩn có độc lực rất cao, cá nhiễm bệnh có hiện tượng viêm màng não [19].

Bên cạnh đó, kết quả điện di sản phẩm multiplex-PCR xác định gen độc lực cho thấy, chủng 015-RIA1 mang 12 gen độc lực thuộc 3 nhóm gen độc lực chính. *S. agalactiae* được biết đến là

vi khuẩn có khả năng xâm lấn cao, gây viêm nhiễm, nhiễm trùng huyết và tử vong ở vật chủ. Cơ chế độc lực của vi khuẩn thông qua ba bước liên tiếp như sau: (i) bám dính và xâm lấn trên bề mặt vật chủ, (ii) xâm lấn qua các tế bào biểu mô và (iii) trốn tránh miễn dịch để thoát khỏi khả năng miễn dịch của vật chủ. Từ các bộ gen tham chiếu của *S. agalactiae*, người ta đề xuất rằng có ba cụm gen độc lực của vi khuẩn [10]. Nhóm gen thứ nhất, nhóm gen bám dính, thúc đẩy sự bám dính của vi khuẩn với bề mặt tế bào chủ; ví dụ, các protein liên kết với fibrinogen cho phép vi khuẩn liên kết với các tế bào biểu mô và protein ngoại bào [20]. Nhóm thứ hai, xâm lấn, là những yếu tố cho phép vi khuẩn kết dính vượt qua niêm mạc và hàng rào máu não [21]. Nhóm yếu tố độc lực cuối cùng, xâm nhiễm hệ miễn dịch; ví dụ, CspA (Protease serine) tham gia vào quá trình phân cắt fibrinogen, phân hủy chemokine và bảo vệ vi khuẩn khỏi quá trình thực bào của vật chủ [22], [23]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hồ sơ gen độc lực của 015-RIA1 là *fbsA*⁺, *fbsB*⁺, *pavA*⁺, *lmb*, *scpB*, *cylE*⁺, *cfb*⁺, *spb1*⁺, *hylB*⁺, *rib*⁺, *bca*⁺, *bac*⁺, *cspA*⁺ và *pbp1A/ponA*⁺; thiếu gen *lmb* (~ 150 bp) ở nhóm Multiplex II và gen *scpB* (~ 250 bp) ở nhóm Multiplex III. Hồ sơ kiểu gen độc lực của chủng 015-RIA1 trong nghiên cứu này tương ứng với các chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá rô phi ở Trung Quốc, Thái Lan và Philippine [7], [8], [11].

Kết quả cho thấy chủng 015-RIA1 là chủng vi khuẩn Ia, chứa 12 gen độc lực chính, tương ứng với những chủng gây bệnh cho cá rô phi ở nhiều quốc gia. Điều này cho thấy rằng 015-RIA1 là chủng mang độc lực.

3.2. Kết quả xác định liều LD₅₀ của vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1

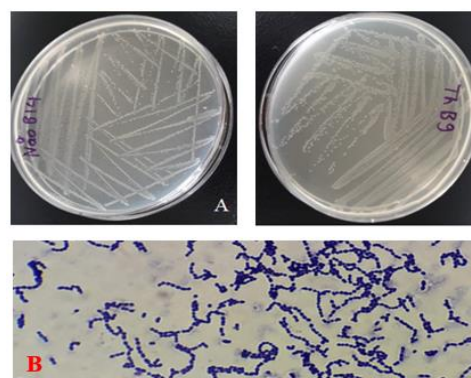
Kết quả tái phân lập lại vi khuẩn *S. agalactiae* sau khi cảm nhiễm

Sau cảm nhiễm với chủng 015-RIA1, cá xuất hiện các dấu hiệu lâm sàng, dấu hiệu bệnh lý điển hình của bệnh xuất huyết như cá bơi lơ lơ ở tầng mặt hoặc xoay tròn mất phương hướng, mắt lồi hoặc đục (hình 3A,B); xuất huyết ở vây ngực, vây bụng, mang tái nhạt, bụng trương to (hình 3C); gan, thận, lá lách sưng huyết và mềm nhũn, xoang bụng chứa nhiều dịch (hình 3D). Dấu hiệu cá nhiễm bệnh trong nghiên cứu này tương đồng với kết quả nghiên cứu bệnh lý ở cá rô phi bị bệnh do GBS trong điều kiện ao nuôi thương phẩm [24], [25] và trong điều kiện gây cảm nhiễm thí nghiệm [26], [27].



Hình 3. Dấu hiệu bệnh lý của cá rô phi sau cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1

(A: cá bị lồi mắt; B: cá bị đục mắt; C: gan, thận cá bị sưng nhũn; D: cá bị xuất huyết ở vây, mang)

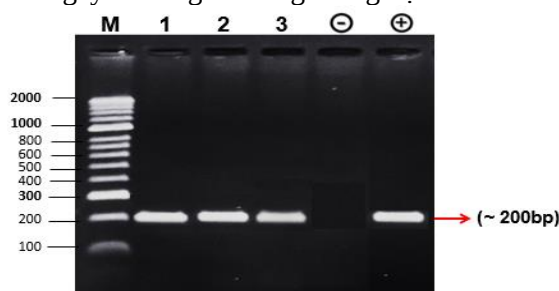


Hình 4. Hình dạng khuẩn lạc và vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1

(A: Hình thái khuẩn lạc mọc trên TSA, B: Hình thái vi khuẩn nhuộm gram)

Kết quả phân lập lại vi khuẩn GBS từ mẫu cá nhiễm bệnh được thể hiện ở hình 4. Kết quả nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường TSA cho thấy, hình thành những khuẩn lạc lồi, rìa nhẵn, màu trắng đục, đường kính 1 mm (Hình 4A). Bên cạnh đó, vi khuẩn phân lập được xác định là vi khuẩn Gram (+), có dạng cầu khuẩn, kết nối với nhau thành dạng chuỗi dài, bắt màu tím xanh của thuốc nhuộm Crystal Violet (Hình 4B).

Định danh loài vi khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử được thể hiện qua hình 5. Tên loài vi khuẩn được kiểm chứng lại theo quy trình của Berridge và cộng sự (2001) [17] bằng phương pháp Nested PCR, khuếch đại vùng gen 16S-23S rRNA đặc hiệu cho vi khuẩn GBS. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, sản phẩm PCR ở mẫu vi khuẩn phân lập được xuất hiện vạch băng (~ 200bp) trùng khớp với đối chứng dương; trong khi mẫu đối chứng âm không xuất hiện vạch băng DNA (Hình 5). Như vậy, việc tái phân lập lại vi khuẩn đã xác định tác nhân gây tử vong cá trong thí nghiệm là vi khuẩn *S. agalactiae*.



Hình 5. Hình ảnh điện di sản phẩm Nested PCR khuếch đại vùng gen 16S-23S rRNA vi khuẩn *S. agalactiae* trên gel agarose 2%

Ghi chú: Giếng 1,2,3: Mẫu cá nhiễm bệnh cảm nhiễm *S. agalactiae*; Giếng (-): Mẫu đối chứng âm;

Giếng (+): Mẫu đối chứng dương chủng chuẩn

ATCC 13813; Giếng M: Ladder 50bp

Kết quả xác định liều LD_{50} của vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1

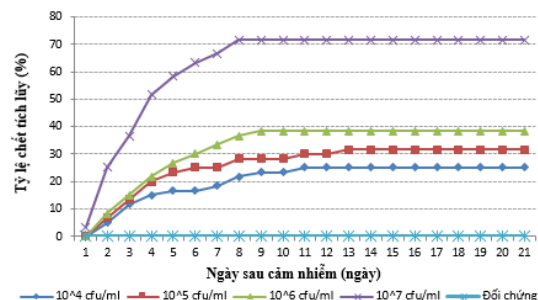
Kết quả thí nghiệm xác định liều LD_{50} của chủng 015-RIA1 được trình bày qua hình 6.

Sau khi cảm nhiễm, tỷ lệ tử vong được quan sát thấy ở tất cả các nghiệm thức thí nghiệm ở ngày thứ nhất và ngày thứ hai, cá thể chết đầu tiên được ghi nhận sau 18h cảm nhiễm; trong khi nghiệm thức đối chứng không xuất hiện cá chết. Tỷ lệ tử vong tích lũy cao nhất sau 8 ngày cảm nhiễm (71,67% ở liều tiêm 10^7 cfu/ml). Liều LD_{50} của chủng 015-RIA1 trên cá rô phi vằn chọn giống sinh trưởng đã xác định được là $1 \times 10^{6,35}$ cfu/ml ($\sim 2,2 \times 10^6$ cfu/ml) sau 21 ngày thử thách.

Kết quả nghiên cứu xác định liều gây chết LD_{50} của chúng tôi tương đương với nghiên cứu trước đây của He và cộng sự (2018) với liều gây chết LD_{50} là $7,7 \times 10^6$ cfu/ml [28]. Nồng độ gây chết của vi khuẩn tùy thuộc vào sự miễn cảm của từng loài cá, dòng cá khác nhau [29]. Trong nghiên cứu của Harbi (1996) [30] đã xác định LD_{50} ở cá rô phi vằn là $9,2 \times 10^7$ cfu/ml, ở cá rô phi xanh (*O. aureus*) là 2×10^7 cfu/ml và ở cá rô phi đen (*O. mossambicus*) là $2,8 \times 10^5$ cfu/ml. Bên cạnh đó, liều gây chết LD_{50} có sự khác nhau giữa các giai đoạn phát triển của cá. Liều LD_{50} của vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi trưởng thành là $2,3884 \times 10^7$ [31]; trong khi cá rô phi giống nhỏ hơn 20g có khả năng kháng với vi khuẩn GBS, sẽ không bị nhiễm bệnh khi cảm nhiễm [32].

Xác định liều gây chết LD_{50} của vi khuẩn *S. agalactiae* là cơ sở cho nghiên cứu chọn giống cá rô phi kháng bệnh. Kết quả nghiên cứu này sẽ được ứng dụng để cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi vằn; so sánh sự sai khác giữa hai nhóm (sống/chết sau cảm nhiễm) nhằm xác định các chỉ thị SNP/microsatellite tiềm năng liên quan đến khả năng kháng bệnh trên cá rô phi vằn. Nhiều nghiên cứu cũng đã ứng dụng thành công trong nghiên cứu chọn giống và phát triển chỉ thị phân tử liên quan đến khả năng kháng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi vằn. Nghiên cứu phát triển chỉ thị SNPs liên kết với gen MCP-8 và dua-1 với khả năng kháng bệnh do *S. agalactiae* trên cá rô phi vằn [33]. Trong chọn giống cá rô phi kháng bệnh do *S. agalactiae* ở Philippine, nhóm nghiên cứu đã ứng dụng thành công liều LD_{50} sau 96h (1×10^9 cfu/ml) vào chọn tạo cá rô phi kháng bệnh [34].

4. Kết luận



Hình 6. Tỷ lệ chết tích lũy của cá rô phi vằn sau cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1

Nghiên cứu đã xác định độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* 015-RIA1, đây là chủng có độc lực chứa 12 gen độc lực và kiểu huyết thanh Ia. Liều gây chết LD₅₀ được xác định là 2,2 x10⁶ cfu/ml sau 21 ngày thử thách. Đây là chủng vi khuẩn phù hợp cho nghiên cứu khả năng kháng bệnh trên cá rô phi vằn.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 08/2019/TN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] FAO, *FAO Yearbook*. Fishery and Aquaculture Statistics 2019/FAO annuaire/Rome, 2021.
- [2] W. Miao and W. Wang, "Trends of aquaculture production and trade: Carp, tilapia, and shrimp," *Asian Fisheries Science*, vol. 33, pp. 1-10, 2020, doi: 10.33997/j.afs.2020.33.S1.001.
- [3] M. Amal and M. N. A. Zamri-Saad, "Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review," *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, vol. 34, no. 2, pp. 195-206, 2011.
- [4] X. Ye, J. Li, M. Lu, G. Deng, X. Jiang, Y. Tian, Y. Quan, and Q. Jian, "Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China," *Fisheries Science*, vol. 77, pp. 623-632, 2011, doi: 10.1007/s12562-011-0365-4.
- [5] H. T. Dong, K. V. Nguyen, and H. T. Nguyen, "Some characteristics of *Streptococcus agalactiae*, causative agent of Streptococcosis disease of tilapia in Northern Vietnam," National Aquaculture Conference for Student and Young Scientists, Nha Trang University, 2011, pp. 348-356.
- [6] R. Imperi, M. Pataracchia, M. Alfàrone, G. Baldassarri, L. Orefici, and G. Creti, "A multiplex PCR assays for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 80, pp. 212-214, 2010.
- [7] I. H. K. Kannika, D. Pisuttharachai, P. Srisapoom, J. Wongtavatchai, H. Kondo, and N. Areechon, "Molecular serotyping, virulence gene profiling and pathogenicity of *S. agalactiae* isolated from tilapia farms in Thailand by multiplex PCR," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 122, pp. 1497-1507, 2017.
- [8] F. S. Legario, C. H. Choresca, J. F. Turnbull, and M. Crumlish, "Isolation and molecular characterization of streptococcal species recovered from clinical infections in farmed Nile tilapia in the Philippines," *Journal of Fish Diseases*, vol. 43, pp. 1431-1442, 2020, doi: 10.1111/jfd.13247.
- [9] G. C. Chattopadhyay, D. Carey, A. J. Caliot, E. Webb, R. I. Layton, J. R. Wang, Y. Bohnsack, J. F. Adderson, and E. E. Ulett, "Phylogenetic Lineage and Pilus Protein Spb1/SAN1518 Affect Opsonin-Independent Phagocytosis and Intracellular Survival of Group B *Streptococcus*," *Microbes Infect*, vol. 13, no. 4, pp. 369-382, 2011, doi: 10.1016/j.micinf.2010.12.009.
- [10] F. P. Y. Lin, R. Lan, V. Sintchenko, G. L. Gilbert, F. Kong, and E. Coiera, "Computational bacterial genome-wide analysis of phylogenetic profiles reveals potential virulence genes of *Streptococcus agalactiae*," *PLoS ONE*, vol. 6, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0017964.
- [11] X. Zhang, D. Li, A. Guo, Y. Zhang, Q. Chen, and X. Gong, "Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* in diseased farmed tilapia in China," *Aquaculture*, vol. 412-413, pp. 64-69, 2013.
- [12] S. C. Sudpraseart, C. Wang, and P. C. Chen, "Phenotype, genotype and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from cultured tilapia (*Oreochromis spp.*) in Taiwan," *Journal of Fish Diseases*, pp. 1-10, 2020, doi: 10.1111/jfd.13296.
- [13] M. N. A. Syuhada, R. Zamri-Saad, M. Ina-Salwany, M. Y. Mustafa, M. Nasruddin, N. N. Desa, M. N. M. Nordin, S. A. Barkham, and T. Amal, "Molecular characterization and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* serotypes Ia ST7 and III ST283 isolated from cultured red hybrid tilapia in Malaysia," *Aquaculture*, vol. 515, 2020, Art. no. 734543.
- [14] A. Chideroli, M. Dangwetngam, A. Issaro, W. Phromkunthong, and N. Suanyuk, "Pathological manifestations and immune responses of serotypes Ia and III *Streptococcus agalactiae* infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)," *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, vol. 36, no. 5, pp. 499-506, 2014.
- [15] B. R. Berridge, H. Bercovier, and P. F. Frelie, "*Streptococcus agalactiae* and *S. difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR," *Vet Microbiol*, vol. 78, no. 2, pp. 165-173, 2001.

- [16] M. Imperi, M. Pataracchia, G. Alfarone, L. Baldassarri, G. Orefici, and R. Creti, "A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 80, pp. 212-214, 2010, doi: 10.1016/j.mimet.2009.11.010.
- [17] N. H. Pham, H. T. Vu, T. T. Vu, T. N. Phu, U. T. Pham, N. T. Nguyen, T. A. Pham, and V. T. Phan, "Application of Multiplex-PCR to determine serotype and virulence genes of *Streptococcus agalactiae* causing disease in Nile tilapia," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 227, no. 10, pp. 259-267, 2022.
- [18] L. J. Reed and H. Muench, "A simple method of estimating fifty per cent endpoints," *American Journal of Epidemiology*, vol. 27, no. 3, pp. 493-497, 1938.
- [19] G. Liu, W. Zhang, and C. Lu, "Comparative genomics analysis of *Streptococcus agalactiae* reveals that isolates from cultured tilapia in China are closely related to the human strain A909," *BMC genomics*, vol. 14, no. 1, pp. 1-10, 2013.
- [20] M. Buscetta, S. Papasergi, A. Firon, G. Pietrocola, C. Biondo, G. Mancuso, A. Midiri, and L. Romeo, "FbsC, a novel fibrinogen-binding protein, promotes *Streptococcus agalactiae*-host cell interactions," *J Biol Chem*, vol. 289, pp. 21003-21015, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.553073.
- [21] S. L. Kenzel and P. Henneke, "Interaction of *Streptococcus agalactiae* and cellular innate immunity in colonization and disease," *Front Immunol*, vol. 519, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00519.
- [22] T. O. Harris, D. W. Shelver, J. F. Bohnsack, and C. E. Rubens, "A novel Streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen," *J Clin Invest*, vol. 111, pp. 61-70, 2003.
- [23] J. D. Bryan and D. W. Shelver, "*Streptococcus agalactiae* CspA is a serine protease that inactivates chemokines," *J Bacteriol*, vol. 191, pp. 1847-1854, 2009.
- [24] H. Anshary, R. A. Kurniawan, S. Sriwulan, R. Ramli, and D. V. Baxa, "Isolation and molecular identification of the etiological agents of streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in net cages in Lake Sentani, Papua, Indonesia," *Springerplus*, vol. 3, no. 627, pp. 1-11, 2014.
- [25] Amrullah, I. Baga, A. A. Jaya, and Wahidah, "*Streptococcus agalactiae* whole cell bacteria toxin protein in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*," *AACL Bioflux*, vol. 11, no. 2, pp. 460-468, 2018.
- [26] M. Alsaïd, F. A. Ali, Hassan, H. D. Noordin, K. B. Siti, M. A. Yasser, and A. H. Ruhil, "Haematological, biochemical and clinical signs changes following experimental infection of *S. agalactiae* in red hybrid tilapia," *Basic Research Journal of Agricultural Science and Review*, vol. 4, no. 9, pp. 289-295, 2015.
- [27] C. A. Iregui, J. Comas, G. M. Vásquez, and N. Verjan, "Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp," *Journal of Fish Disease*, vol. 39, no. 2, pp. 205-215, 2015.
- [28] Y. He, J. L. Huang, K. I. Wang, D. F. Chen, Y. Geng, X. L. Huang, P. O. Yang, Y. Zhou, J. Wang, J. Min, and W. M. Lai, "Pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* in *Oreochromis niloticus*," *Oncotarget* 5, vol. 9, no. 1, pp. 401-413, 2018.
- [29] W. Agnew and A. C. Barnes, "*Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination," *Veterinary Microbiology*, vol. 122, pp. 1-15, 2007.
- [30] A. H. Harbi, "Susceptibility of five species of tilapia to *Streptococcus* sp," *Asian Fisheries Science*, vol. 9, pp. 177-181, 1996.
- [31] N. N. Mansor, M. F. Nawî, S. Yusoff, S. Abdullah, and M. Zamri-Saad, "Determination of LD50 for *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* infections in tilapia," *J. Vet. Malaysia*, vol. 23, no. 2, pp. 22-27, 2011.
- [32] A. Jiménez, V. Tibatá, H. Junca, N. Fernando, and C. Egui, "Evaluating a nested-PCR assay for detecting *Streptococcus agalactiae* in red tilapia (*Oreochromis* sp.) tissue," *Aquaculture*, vol. 321, pp. 203-206, 2011.
- [33] Y. Shen, K. Ma, F. Liu, and G. H. Yue, "Characterization of two novel gadd45a genes in hybrid tilapia and their responses to the infection of *Streptococcus agalactiae*," *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 54, pp. 276-281, 2016.
- [34] W. Suebsong, S. Poompuang, P. Srisapoom, S. Koonawootrittriron, A. Luengnarumitchai, H. Johansen, and M. Rye, "Selection response for *Streptococcus agalactiae* resistance in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*," *Journal of Fish Diseases*, vol. 01, pp. 1-10, 2019.