

**PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ TÌNH TRẠNG KHÁNG KHÁNG SINH
CỦA VI KHUẨN *Streptococcus agalactiae* GÂY BỆNH MÙ MẮT
TRÊN ẾCH THÁI LAN (*Rana tigerina*) NUÔI TẠI MỘT SỐ TỈNH PHÍA BẮC**

**Đặng Thị Hóa, Vũ Đức Mạnh, Tô Thị Ngọc Anh,
Trần Thị Trinh, Đoàn Thị Ninh, Kim Văn Vạn, Trương Đình Hoài***

Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: tdhoai@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 16.12.2022

Ngày chấp nhận đăng: 27.03.2023

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định một số đặc điểm bệnh, phân lập, định danh và đánh giá tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh lồi, đục mắt trên ếch Thái Lan (*Rana tigerina*) nuôi tại một số tỉnh miền Bắc. Mẫu ếch ($n = 83$) phục vụ nghiên cứu được thu tại 26 hộ nuôi ở ba tỉnh Hà Nội, Hà Nam và Thái Bình đang xuất hiện hiện tượng lồi đục mắt. Kết quả kiểm tra cho thấy ngoài triệu chứng chính lồi đục mắt, đục một hoặc hai bên mắt chiếm tỷ lệ cao (78,3%), ếch bệnh còn có biểu hiện da sẫm màu (53,0%), gan sưng, xuất huyết (69,9%), dịch mắt, não, thận và gan ếch chứa nhiều vi khuẩn (100%). Kết quả nuôi cấy, phân lập cho thấy khuẩn lạc vi khuẩn có dạng tròn, lồi, màu kem, đường kính khoảng 1mm, bắt màu Gram (+), dạng liên cầu. Giám định hình thái, sinh hoá và PCR cho thấy 26 chủng phân lập được đều là *Streptococcus agalactiae*. Kết quả cảm nhiễm cho thấy liều gây chết 50% (LD_{50}) của ba chủng đại diện nằm trong khoảng $1,2 \times 10^4 - 3,5 \times 10^4$ CFU/ếch. Vi khuẩn có tỷ lệ kháng cao (61,5%) đối với oxytetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim, trong khi các loại kháng sinh amoxicillin, florfenicol, erythromycin có tỷ lệ nhạy từ 65,4-80,8%. Kết quả nghiên cứu là cơ sở để xây dựng biện pháp kiểm soát bệnh mù mắt trên ếch nuôi.

Từ khóa: Bệnh mù mắt, ếch, *S. agalactiae*, kháng kháng sinh.

**Isolation and Antimicrobial Susceptibility
of *Streptococcus agalactiae* Causing Cloudy-eye Disease
in Thai Frog (*Rana tigerina*) Cultured in Northern Vietnam Provinces**

ABSTRACT

The study was conducted to determine the disease characteristics, isolation, identification, and evaluation of antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* causing blindness in Thai frog (*Rana tigerina*) raised in Northern provinces of Vietnam. The infected frogs ($n = 83$) were sampled from 26 frog-raising farms in Hanoi, Ha Nam, and Thai Binh provinces. Infected frogs exhibited opaque eyes, blindness in one or both eyes (78.3%), skin darkening (53.0%), and swelling and hemorrhage liver (69.9%). The bacteria isolated from the eye, brain, kidney and liver of infected frogs were round, convex, cream-coloured, pinpoint (1mm), Gram (+), and of coccus type. Twenty six strains isolated from frogs were identified as *S. agalactiae* based on morphological, biochemical, and PCR analysis. The LD_{50} of three representative strains were between 1.2×10^4 to 3.5×10^4 CFU/frog. The isolated bacteria were highly resistant to oxytetracycline and sulfamethoxazole/trimethoprim (61.5%), but highly sensitive to amoxicillin, florfenicol, and erythromycin (65.4-80.8%). These results provides useful information for effective prevention of the disease caused by *S. agalactiae* in cultured frogs.

Keywords: Cloudy-eye disease, frog, *S. agalactiae*, antibiotic resistance.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ếch là một loài nuôi phổ biến ở nhiều quốc gia châu Á (Somsiri & Soontornvit, 2002; Xie & cs., 2009), trong đó có Việt Nam (Lưu Thị Thanh Trúc & cs., 2008), phục vụ nhu cầu trong nước và xuất khẩu (Nguyễn Công Tráng & Nguyễn Bảo Duy, 2020). Thịt ếch được đánh giá là một nguồn protein ưu việt, có thể thay thế một số nguồn protein động vật khác (Omoniyi & cs., 2012). Tại Việt Nam, ếch được coi là loài dễ nuôi, sinh trưởng nhanh, được nuôi ở nhiều địa phương với quy mô vừa và nhỏ (Lưu Thị Thanh Trúc & cs., 2008), đặc biệt phát triển mạnh trong những năm gần đây ở nhiều tỉnh phía Bắc.

Tuy nhiên, chính sự phát triển nhanh và ô ạt về quy mô, diện tích nuôi đã dẫn đến nhiều rủi ro cho nghề nuôi ếch hiện nay, đặc biệt là vấn đề dịch bệnh. Một số bệnh nguy hiểm phải kể đến là bệnh nhiễm khuẩn trên ếch như đốm đỏ do vi khuẩn *A. hydrophilla* (Lưu Thị Thanh Trúc & cs., 2008), bệnh lồi, đục mắt do vi khuẩn *S. agalactiae* (Nguyễn Ngọc Phước & cs., 2020). Bệnh xảy ra nhiều nơi và diễn biến phức tạp, gây nhiều thiệt hại cho người nuôi. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* tại nước ta chủ yếu tập trung vào các đối tượng như trên rô phi (Trương Đình Hoài & cs., 2014), trên cá trắm đen (Kim Văn Vạn & Trương Đình Hoài, 2021). Nghiên cứu tác nhân này trên ếch mới chỉ thực hiện ở quy mô và phạm vi nhỏ (Nguyễn Ngọc Phước & cs., 2020) và các nghiên cứu về dịch bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra trên ếch tại miền Bắc còn rất hạn chế. Việc thiếu thông tin dịch bệnh và sử dụng thuốc điều trị bừa bãi có thể dẫn đến quá trình điều trị không mang lại hiệu quả, giảm tỷ lệ sống, tăng tính kháng kháng sinh, tồn dư kháng sinh trong thịt ếch làm ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng và nguy cơ gây ô nhiễm môi trường. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện để làm rõ một số đặc điểm bệnh mù mắt do vi khuẩn *S. agalactiae* trên ếch Thái Lan tại một số tỉnh phía Bắc, đánh giá mức độ kháng kháng sinh để cung cấp thông tin nhằm xây dựng giải pháp phòng trị bệnh hiệu quả và phát triển bền vững nghề nuôi ếch tại Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Nghiên cứu được thực hiện trên mẫu ếch nhiễm bệnh lồi, đục mắt thu tại ba tỉnh Hà Nội, Hà Nam và Thái Bình Hà Nội từ tháng 4 đến tháng 9/2022.

Các trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất phục vụ cho quá trình thu mẫu, nuôi cấy, phân lập và định danh vi khuẩn, cảm nhiễm kháng định tác nhân và đánh giá độc lực, đánh giá mức kháng kháng sinh của vi khuẩn sau định danh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu mẫu và xác định dấu hiệu bệnh lý

Để thực hiện nghiên cứu, 83 mẫu ếch trong bể nuôi đang có hiện tượng lồi, đục mắt được thu ngẫu nhiên tại 26 hộ nuôi tại 3 tỉnh Hà Nội (9 hộ, n = 27), Hà Nam (6 hộ, n = 21), Thái Bình (11 hộ, n = 35), số lượng thu từ 3-5 con/hộ, mẫu ếch còn sống được vận chuyển về phòng thí nghiệm bằng các thùng xốp sạch có lỗ thông khí. Thời gian thu thập mẫu và thực hiện các thí nghiệm từ tháng 4 đến tháng 09/2022.

Các biểu hiện triệu chứng bên ngoài được ghi chép, ếch sau đó được mổ và quan sát dấu hiệu bệnh lý đại thể của các nội quan. Đồng thời mẫu tươi từ não, mắt, thận, gan được phết và nhuộm Gram (Merck, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất để xác định sơ bộ sự có mặt và hình thái của vi khuẩn trong mô bào.

2.2.2. Nuôi cấy, phân lập vi khuẩn

Tất cả các mẫu ếch bệnh sau khi kiểm tra được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường Tryptic Soy Agar (TSA, Himedia, Ấn Độ) ở nhiệt độ 28-30°C trong vòng 24-48h.

Các chủng vi khuẩn sau phân lập được quan sát hình dạng, màu sắc, kích thước khuẩn lạc và tiến hành nuôi cấy thuần. Các chủng vi khuẩn thuần được bảo quản trong môi trường TSB (Tryptic Soy Broth, Himedia, Ấn Độ) bổ sung 20% glycerol (v/v) và giữ trong điều kiện âm sâu (-80°C) theo phương pháp của (Hoai & cs., 2019) để sử dụng cho các nội dung nghiên cứu tiếp theo.

2.2.3. Xác định đặc điểm hình thái, sinh hóa

Các chủng vi khuẩn thuần được lựa chọn ngẫu nhiên từ các hộ nuôi (01 chủng/hộ thu mẫu) và tiến hành xác định hình thái vi khuẩn bằng nhuộm Gram theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Merck, Đức) và thử các phản ứng sinh hóa bằng bộ kit API 20 strep (Biomerieux, France). Các đặc điểm về hình thái vi khuẩn và các đặc tính sinh hóa được xác định theo mô tả của Austin & cs. (2007). Kết quả sau test các phản ứng sinh hóa được đọc dựa vào bảng hướng dẫn và tra phần mềm Apiweb hoặc bảng đối chiếu (API 20E profile index) để xác định giống/loài vi khuẩn thử nghiệm.

2.3.4. Giám định bằng PCR

Các chủng vi khuẩn sau định danh sơ bộ thành công bằng hình thái, sinh hóa được đưa vào tách chiết DNA theo kit InstaGene™ Matrix (Bio-Rad). Quy trình chiết tách DNA được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, các mẫu DNA sau tách được lưu ở điều kiện -20°C để sử dụng trong quá trình định danh bằng sinh học phân tử. Sử dụng cặp mồi đặc hiệu IGS-F (Forward): 5'- GAGTTTGATCATGGGTCAG và IGS-R (Reverse): 5'- ACCAACATGTGTTAAT TACTC - 3' khuếch đại đoạn gene 16S rRNA để giám định các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* theo nghiên cứu của Deer & cs. (2010).

Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 5,5μl nuclease-free water; 12,5μl 2X Go Taq green master mix (Promega); 1μl Mồi ngược (10 pmole); 1μl mồi xuôi (10 pmole) và 5μl khuôn mẫu DNA. Đối chứng dương sử dụng trong phản ứng PCR là chủng *S. agalactiae* VNUA - 2020, đây là chủng đối chứng dương được cung cấp từ Học viện Nông nghiệp Việt Nam, đối chứng âm là hỗn hợp phản ứng không chứa DNA và thay bằng PBS.

Chu trình nhiệt được thực hiện đối với đoạn mồi xác định giống *S. agalactiae* bao gồm: tiền biến tính ở 94°C trong 2 phút; chu kỳ lặp lại 30 lần; biến tính ở 95°C trong 30 giây, gắn mồi ở 53°C trong 45 giây, tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 30 giây; hoàn thành ở 72°C trong 10 phút

(Deer & cs., 2010). Sản phẩm PCR được điện di trên gel 1,5% (TBE 1X) với thang DNA chuẩn 100bp (marker). Sử dụng nguồn điện di ở hiệu điện thế 100V cường độ 100mA, thời gian chạy điện di trong 30 phút. Sản phẩm PCR nếu dương tính sẽ cho vạch sáng ở vị trí 474bp.

2.2.5. Cảm nhiễm và xác định mức độ độc lực của vi khuẩn

Tiến hành lựa chọn ngẫu nhiên 03 chủng (01 chủng/tỉnh) để cảm nhiễm trên ếch theo phương pháp tiêm xoang bụng. Ếch được đưa vào cảm nhiễm có trọng lượng khoảng 30-35 g/con và được nuôi thuần trong 1 tuần trước khi tiến hành thí nghiệm. Chủng vi khuẩn thuần được tăng sinh trên môi trường TSB và điều chỉnh về 10⁸ CFU/ml bằng phương pháp đo mật độ quang (OD600), kết hợp với cấy trên đĩa thạch. Dịch khuẩn sau đó được pha loãng thành dãy nồng độ (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 1 × 10⁸ CFU/ml) để tiêm cảm nhiễm cho ếch kèm theo 1 lô đối chứng (tiêm PBS) trên mỗi chủng vi khuẩn. Với mỗi nồng độ vi khuẩn, tiến hành tiêm 15 con/bể với lượng 0,1 ml/ếch vào xoang bụng ếch và được nuôi theo dõi trong các bể có thể tích 120 lít, mỗi nồng độ tiêm được bố trí lặp lại 3 lần. Để xác định tỷ lệ chết tích lũy và biểu hiện ếch nhiễm bệnh, thí nghiệm được tiến hành theo dõi trong 14 ngày. Mẫu ếch cảm nhiễm sau khi chết hoặc có các biểu hiện bệnh được thu để quan sát triệu chứng, bệnh tích, nhuộm gram, soi tươi quan sát sự xuất hiện của vi khuẩn trong mô bào. Một số mẫu ếch được nuôi cấy, phân lập lại vi khuẩn và được giám định nhanh bằng PCR để khẳng định lại tác nhân gây bệnh. Liều gây chết 50% cá thí nghiệm (LD₅₀, lethal dose) được xác định theo công thức của Reed & Muench (1938) như sau:

$$LD_{50} = 10^{(a - pd)}$$

$$\text{Với } pd = \frac{(L\% - 50\%)}{(L\% - H\%)}$$

Trong đó: a: Số lữ thừa mà tại đó vi khuẩn gây chết cá thấp nhất (trên 50%); H: Tỷ lệ cá chết cao nhất (dưới 50%); L: Tỷ lệ cá chết thấp nhất (trên 50%).

2.2.6. Đánh giá mức độ nhạy/kháng của vi khuẩn *S. agalactiae* với kháng sinh

Các chủng vi khuẩn sau giám định loài được sử dụng để đánh giá mức độ nhạy/kháng theo phương pháp đĩa kháng sinh khuếch tán trên đĩa thạch theo phương pháp của Bauer (1966). Thử nghiệm được tiến hành trên 26 chủng vi khuẩn với 6 loại kháng sinh amoxicillin (AX, 10µg); erythromycin (ER, 15µg); sulfamethoxazole/trimethoprim (SMX/TMP, 23,75/1,25µg); doxycycline (DX, 30µg), oxytetracycline (OTC, 30µg); florfenicol (FL, 30 µg).

Các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* được tăng sinh trên môi trường dinh dưỡng TSB sau 24h tại 28°C Dung dịch nuôi cấy được điều chỉnh về mức 0,5 theo thang chuẩn McFarland

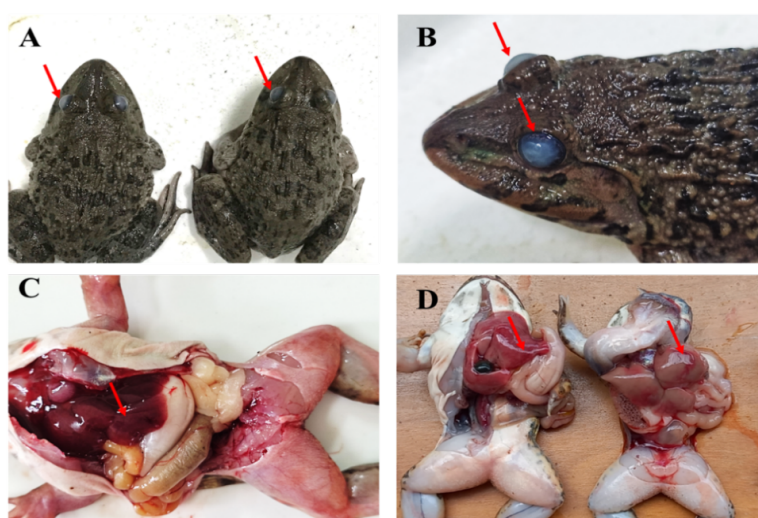
để đạt mật độ vi khuẩn khoảng 1×10^8 CFU/ml và được pha loãng về nồng độ 10^6 CFU/ml, dùng tăm bông đã được khử trùng nhúng vào dung dịch sau đó ria đều trên mặt thạch môi trường TSA. Các đĩa kháng sinh đồ tương ứng được đặt lên đĩa sau khi ria cấy xong. Các đĩa vi khuẩn sau khi đặt KSĐ được ủ ở nhiệt độ 28°C, kết quả được đo sau 24-48h nuôi. Việc xác định mức độ nhạy của kháng sinh (nhạy, nhạy trung bình, kháng) dựa trên tiêu chuẩn CLSI (2016) và CLSI VET4 (2020).

2.2.7. Xử lý số liệu

Các số liệu về đặc điểm dấu hiệu bệnh trên ếch, tỷ lệ ếch chết tích lũy trong quá trình cảm nhiễm, mức độ kháng/nhạy của vi khuẩn với từng loại kháng sinh được tổng hợp và phân tích bằng phần mềm Excel 2016.

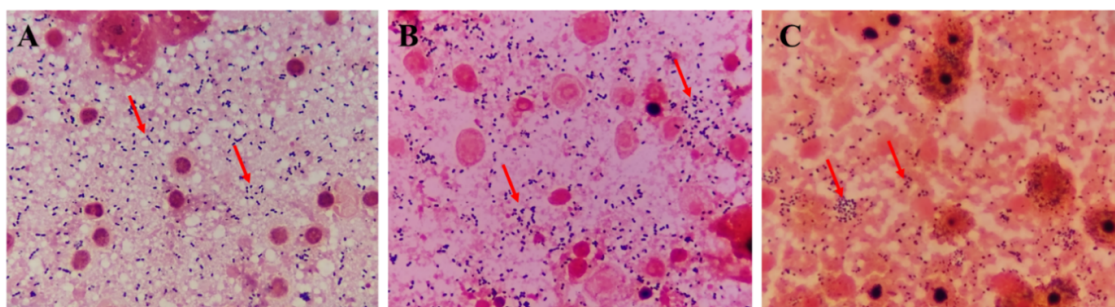
Bảng 1. Bảng tổng hợp đặc điểm lâm sàng ếch nhiễm bệnh (n = 83)

Cơ quan kiểm tra	Dấu hiệu lâm sàng	Số mẫu xuất hiện dấu hiệu	Tỷ lệ (%)
Mắt	Xuất hiện lồi, đục mắt	65	78,3
Da	Xuất huyết, lở loét, đốm đỏ trên da	29	34,9
	Sẫm màu, thay đổi màu sắc	49	59,0
Chân	Sưng to, phù	21	25,3
	Xuất huyết, lở loét	18	21,7
Gan	Sưng, xuất huyết	58	69,9
	Tụ huyết	12	14,5
Bụng	Chướng bụng, phình to	44	53,0



Ghi chú: A, B: Ếch bị lồi, đục mắt; C, D: Gan bị xuất huyết, tụ huyết.

Hình 1. Biểu hiện lâm sàng ếch nhiễm bệnh



Hình 2. Sự hiện diện của vi khuẩn gây bệnh trên mẫu tươi lấy từ ếch bệnh ở các vị trí não (A), mắt (B), thận (C)

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm lâm sàng ếch bệnh

Trong tổng số 83 mẫu, ếch bệnh có triệu chứng điển hình là lồi, đục mắt, đục một hoặc cả hai mắt với tần suất bất gặp là 65/83 mẫu ếch chiếm tỷ lệ 78,3% (Hình 1A-C), đây cũng là một trong những nguyên nhân chính khiến ếch hoạt động chậm chạp, kém linh hoạt. Các triệu chứng khác như da sẫm màu, thay đổi màu sắc, gan sưng, xuất huyết, bụng chướng chiếm tỷ lệ khác cao, dao động trong khoảng 53,0-69,9%. Ngoài ra, ếch xuất huyết trên da, lở loét chân chiếm tỷ lệ thấp (25,3-34,9%) (Bảng 1). Kết quả nhuộm gram mẫu tươi mô não, mắt, thận ếch bệnh cho thấy sự hiện diện của vi khuẩn gram dương, dạng liên cầu khuẩn, nằm rải rác hoặc tập trung thành cụm lớn (Hình 2) và hoàn toàn tương đồng với báo cáo ếch bệnh tại Huế (Nguyễn Ngọc Phước & cs., 2020).

Đặc điểm điển hình của vi khuẩn *S. agalactiae* là tấn công và gây bệnh ở mắt, não gây đục, lồi mắt, xuất huyết não, gây xung huyết và xuất huyết các cơ quan nội tạng và đã được ghi nhận trên nhiều đối tượng nuôi khác nhau cá rô phi (Buller, 2004; Salvador & cs., 2005; Trương Đình Hoài & cs., 2014), cá trắm đen (Kim Văn Vạn & Trương Đình Hoài, 2021), cá rô đồng (Đặng Thị Hoàng Oanh & cs., 2012). Kết quả kiểm tra mẫu mô thận, não của ếch bệnh trong nghiên cứu này cho thấy vi khuẩn xâm nhập, gây vỡ và phá hủy tế bào mô và hồng cầu. Mẫu mô thận có sự hiện diện của nhiều tế bào đại thực bào, vi khuẩn liên cầu và không quan sát thấy sự có mặt của các loài vi khuẩn khác, đặc điểm này hoàn toàn phù hợp với đặc

điểm ếch nhiễm bệnh *S. agalactiae* (Nguyễn Ngọc Phước & cs., 2020).

3.2. Kết quả phân lập, nuôi cấy, thử đặc tính sinh hóa và giám định bằng PCR

Quá trình nuôi cấy vi khuẩn từ 83 mẫu ếch có biểu hiện lồi, đục mắt đều cho thấy vi khuẩn gây bệnh phát triển sau 24-36h ở 28-30°C trên môi trường TSA, khuẩn lạc nhỏ, hình tròn, rìa đều, bóng, hơi lồi, màu kem, tâm hơi đậm, đường kính từ 0,5-0,7mm. Vi khuẩn Gram dương, hình cầu riêng lẻ hoặc bắt cặp với nhau thành đôi hay chuỗi liên kết dài (Hình 3). Các đặc điểm phát triển của vi khuẩn, hình thái khuẩn lạc, hình dạng vi khuẩn cũng được tìm thấy tại các nghiên cứu trước đó của vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi (Buller, 2004; Salvador & cs., 2005; Trương Đình Hoài & cs., 2014).

Do 83 chủng phân lập được rất đồng nhất về cả hình thái khuẩn lạc và hình thái vi khuẩn, do vậy chúng tôi lựa chọn ngẫu nhiên 26 chủng đại diện cho 26 hộ nuôi để tiến hành thêm các bước định danh và giám định. Kết quả thử đặc tính sinh hóa 26 chủng vi khuẩn *S. agalactiae* đại diện từ ếch bệnh của 26 hộ nuôi cho thấy vi khuẩn có tính đồng nhất cao, không di động, phản ứng âm tính với oxidase và catalase, không có khả năng lên men glucose trong cả hai điều

kiện hiếu khí và kỵ khí, phản ứng âm tính với Esculin và Pyrrolidonyl Arylamidase, dương tính với Voges Proskauer, có khả năng thủy phân axit hippuric, hầu hết không có khả năng axit hóa (Bảng 2). Khi tra cứu trên hệ thống online APIWEB của kit API 20 Strep cho kết quả định danh tương đồng với *S. agalactiae* và tương đồng với đặc tính sinh hóa của chủng *S. agalactiae* VNUA - 2020 đối chứng của Học viện Nông nghiệp Việt Nam (Bảng 2) cũng như các chủng được nghiên cứu trước đây (Đặng Thị Hoàng Oanh & Nguyễn Thanh Phương, 2012; Nguyễn Ngọc Phước & cs., 2020).

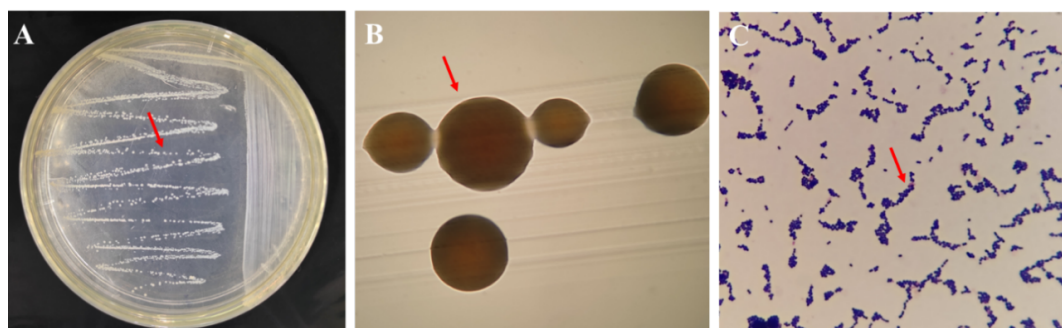
Kết quả giám định PCR đối với 26 chủng vi khuẩn cho thấy 26/26 chủng đều cho kết quả dương tính, với vạch band xuất hiện ở vị trí khoảng 474bp, trùng với vị trí xuất hiện vạch band của chủng đối chứng dương *S. agalactiae* HVN-2020 (Hình 4). Kết hợp các kết quả định danh bằng sinh hóa và giám định PCR cho thấy vi khuẩn phân lập được và gây bệnh mù mắt ở ếch là *S. agalactiae*.

3.3. Kết quả cảm nhiễm và xác định liều gây chết LD₅₀

Kết quả cảm nhiễm xác định liều LD₅₀ được thực hiện trên 3 chủng (01 chủng/tỉnh) bao gồm: ST - E - HN04, ST - E - HN09, ST - E - TB12. Kết quả theo dõi diễn biến sau cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* cho thấy xu hướng ếch chết tương đối giống nhau ở các chủng vi khuẩn. Ở các lô tiêm với nồng độ vi khuẩn cao nhất (10^6 - 10^7 CFU/ếch), ếch bắt đầu chết sau 24-48h tiêm, tỷ lệ chết bắt đầu tăng lên trên 50% sau

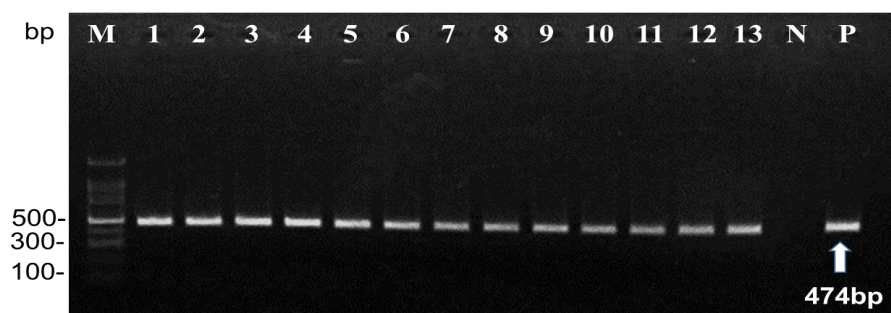
4-5 ngày sau tiêm và đạt mức 68,9-86,7% sau 14 ngày tiêm. Ở nồng độ tiêm thấp hơn (10^5 CFU/ếch), ếch bắt đầu chết sau 2-3 ngày, tỷ lệ chết tích lũy khoảng 60,0%. Trong khi đó, tại nồng độ tiêm 10^4 CFU/ếch, ếch bắt đầu chết sau 5-7 ngày tiêm, chỉ đạt mức 33,0-42,0% và tăng lên 37,8-48,9% sau 14 ngày tiêm. Ở lô tiêm với nồng độ vi khuẩn 10^3 CFU/ếch, tỷ lệ chết của ếch bắt đầu giảm dao động trong khoảng 22,2-40,0% sau 14 ngày. Tại các lô cảm nhiễm với nồng độ thấp nhất (10^1 - 10^2 CFU/ếch, tỷ lệ chết giảm nhanh chỉ đạt mức dưới 22,2% số ếch thí nghiệm sau 14 ngày theo dõi. Giá trị LD₅₀ của ba chủng vi khuẩn thu được trong thí nghiệm dao động ở mức $1,2 \times 10^4$ - $3,5 \times 10^4$ CFU/ếch, trung bình khoảng $2,3 \times 10^4$ CFU/ếch (Bảng 3, Hình 5). Kết quả cảm nhiễm xác định liều gây chết LD₅₀ tại nghiên cứu này tương đồng với nghiên cứu trước đó của Nguyễn Ngọc Phước & cs. (2020) khi xác định liều gây chết trên ếch tại Thừa Thiên Huế dao động từ $6,3 \times 10^3$ - $2,0 \times 10^5$ CFU/ml.

Thực hiện giải phẫu và kiểm tra biểu hiện bệnh tích trên ếch được cảm nhiễm cho thấy hầu hết ếch có các biểu hiện lồi, đục mắt, đục một hoặc cả hai mắt, da sẫm màu, hoạt động kém linh hoạt, khi giải phẫu ếch cảm nhiễm nội quan sưng, xuất huyết (Hình 6) và hoàn toàn tương đồng với các đặc điểm của ếch bị bệnh tự nhiên ngoài thực địa. Kết quả tái phân lập *S. agalactiae* sau khi gây nhiễm trên ếch về các đặc điểm bệnh tích, hình thái và đặc điểm vi khuẩn hoàn toàn tương đồng với nghiên cứu trước đó của Nguyễn Ngọc Phước & cs. (2020).



Ghi chú: A, B: Hình thái khuẩn lạc; C: Hình thái vi khuẩn nhuộm gram.

Hình 3. Hình thái khuẩn lạc *S. agalactiae* trên môi trường thạch sau 48h nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C



Ghi chú: M: Marker. Giếng 1-13: DNA từ vi khuẩn đại diện dương tính với *S. agalactiae*; Giếng N: Đối chứng âm; Giếng P: Đối chứng dương (DNA của *S. agalactiae* VNUA - 2020).

Hình 4. Kết quả giám định bằng PCR mẫu DNA đại diện tách chiết từ mẫu vi khuẩn phân lập từ ếch bệnh mù mắt

Bảng 2. Kết quả thử sinh hóa các chủng vi khuẩn phân lập từ ếch bệnh mù mắt

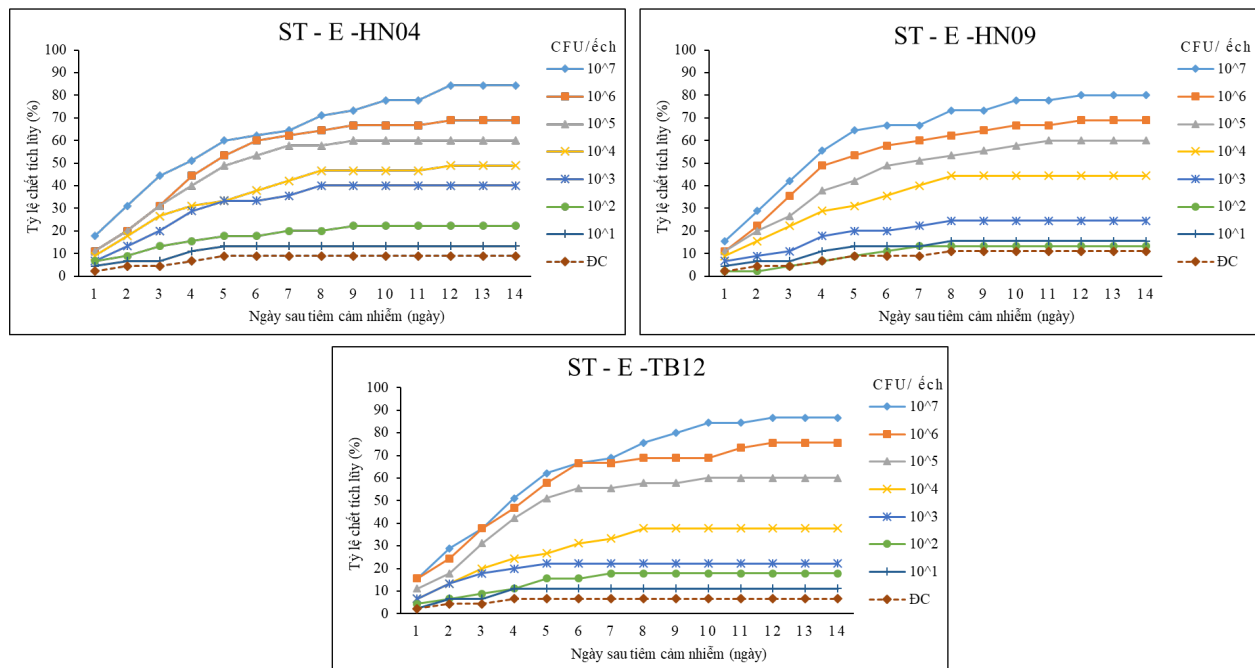
TT	Chỉ tiêu	Chủng vi khuẩn phân lập từ ếch (n = 26)	Đối chứng (<i>S. agalactiae</i> VNUA - 2020)
1	Nhuộm Gram	Gram (+)	Gram (+)
2	Hình dạng	Cầu khuẩn	Cầu khuẩn
3	Di động	-	-
4	Sinh catalaza	-	-
5	Sinh oxidaza	-	-
6	Phản ứng lên men yếm khí	-	-
7	Phản ứng lên men hiếu khí	-	-
8	Mọc trên môi trường máu	-	-
9	Gây tan huyết dạng β	+	+
10	Phản ứng Voges-Proskauer	+	+
11	Hippurate hydrolysis	+	+
12	Bile-esculin tolerance	-	-
13	Pyrrolidonyl arylamidase	-	-
14	Sinh α -galactosidase	-	-
15	Sinh β -glucuronidase	-	-
16	Sinh β -galactosidase	-	-
17	Alkaline phosphatase	+	+
18	Leucine AminoPeptidase	+	+
19	Arginine Dihydrolase	+	+
20	Sử dụng đường	-	-
	Ribose	-	-
	Arabinose	-	-
	Manitol	-	-
	Sorbitol	-	-
	Lactose	+	+
	Trehalose	-	-
	Inulin	-	-
	Raffinose	-	-
	Amidon	-	-
	Glycogen	-	-

Ghi chú: (+): Phản ứng dương tính; (-): Phản ứng âm tính.

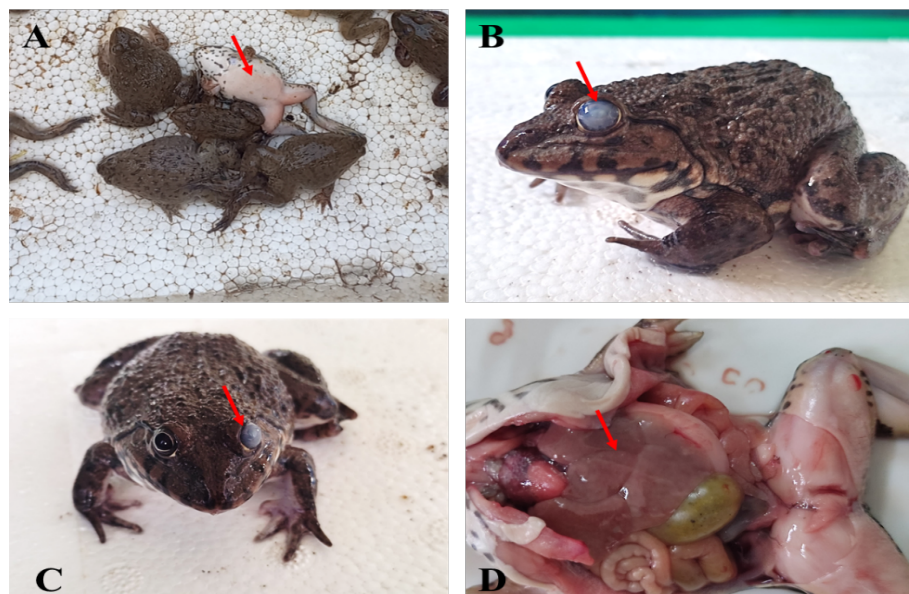
Phân lập và đánh giá tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh mù mắt trên ếch Thái Lan (*Rana tigerina*) nuôi tại một số tỉnh phía Bắc

Bảng 3. Giá trị liều LD₅₀ sau cảm nhiễm ba chủng vi khuẩn *S. agalactiae* đại diện được lựa chọn trên ếch

Tên chủng	Giá trị LD ₅₀ (CFU/ếch)	Giá trị LD ₅₀ trung bình (CFU/ếch)
ST - E -HN04	$1,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$
ST - E -HN09	$2,2 \times 10^4$	
ST - E -TB12	$3,5 \times 10^4$	



Hình 5. Tỷ lệ chết tích lũy của ếch sau khi tiêm cảm nhiễm ba chủng vi khuẩn *S. agalactiae*

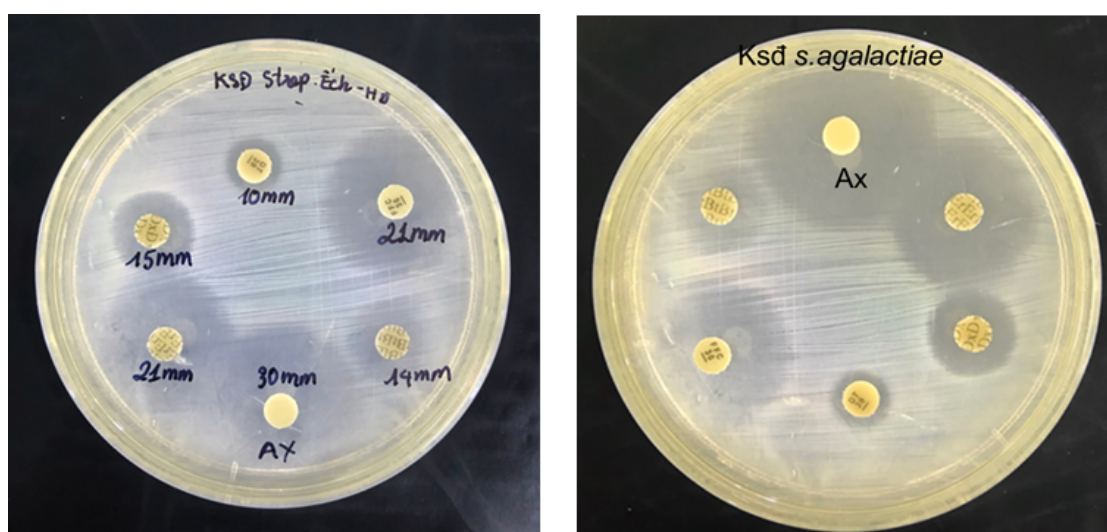


Ghi chú: A: Ếch chết trong quá trình sau cảm nhiễm; B, C: Ếch lồi, đục mắt; D: Gan sưng.

Hình 6. Triệu chứng của ếch cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*

Bảng 4. Kết quả thử kháng sinh đồ các chủng *S. agalactiae* phân lập được từ mẫu ếch Thái Lan (n = 26)

Kháng sinh	Các mức kháng/nhạy - Số chủng (%)		
	Kháng	Nhạy TB	Nhạy
Amoxicillin (Ax)	0,0	19,2	80,8
Erythromycin (Er)	3,8	30,8	65,4
Sulfamethoxazole/Trimethoprim (BT)	73,1	23,1	3,8
Doxycycline (Dx)	0,0	65,4	34,6
Oxytetracycline (OTC)	61,5	29,9	11,5
Florfenicol (FI)	3,8	26,9	69,2



Hình 7. Thử kháng sinh đồ các chủng *S. agalactiae* phân lập được từ mẫu ếch

3.4. Kết quả thử kháng sinh đồ

Kết quả kiểm tra kháng sinh đồ cho 26 chủng *S. agalactiae* trong nghiên cứu cho thấy: Các loại kháng sinh amoxicillin, florfenicol, erythromycin có tỷ lệ nhạy cao đối với vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập từ ếch bệnh với tỷ lệ nhạy > 65,4% (amoxicillin 80,8%, florfenicol 69,2%, erythromycin 65,4%). Trong khi đó, độ nhạy của doxycycline đối với vi khuẩn *S. agalactiae* chỉ ở mức 36,7 %. Vi khuẩn *S. agalactiae* có mức kháng cao kháng với các loại oxytetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim (> 61,5%) (Bảng 4, Hình 7).

Mức độ kháng/nhạy của vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập từ ếch Thái Lan cũng đã được đánh giá trong nghiên cứu của (Nguyễn Ngọc Phước & cs., 2020) tại Thừa Thiên Huế với

100% vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập từ ếch kháng với kháng sinh oxytetracycline và có tỷ lệ nhạy cao với loại kháng sinh oxacilin, ampicillin và amocillin. Trong đó, mức nhạy cao của kháng sinh amoxicillin cũng được ghi nhận trong nghiên cứu này với có tỷ lệ nhạy cao đến 80%. Điều này hoàn toàn tương đồng với đặc điểm nhạy/kháng trên hai loại kháng sinh amoxicillin và oxytetracycline trong nghiên cứu của chúng tôi. Ngoài ra, mức nhạy cao của ba loại kháng sinh amoxicillin, florfenicol, erythromycin cũng ghi nhận tương đồng với kết quả thử nghiệm trên cá trắm đen của nhóm tác giả Kim Văn Vạn & Trương Đình Hoài (2021). Như vậy, nhìn chung vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập từ ếch bệnh vẫn đang có mức độ nhạy cao với một số loại kháng sinh nhưng amoxiciline, erythromycin và florfenicol (65,4-80,8%), nhưng với các loại kháng

sinh quan trọng khác như sulfamethoxazole/trimethoprim, oxytetracycline và doxycycline cho thấy tỉ lệ nhạy cao chỉ chiếm tỷ lệ thấp, lần lượt ở mức 3,8%; 11,5% và 34,6%. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin quan trọng trong việc lựa chọn loại kháng sinh phù hợp trong quá trình điều trị bệnh và tính cấp thiết trong việc cần phải thử kháng sinh đồ và sử dụng kháng sinh hợp lý trong điều trị nhằm duy trì độ nhạy và giảm thiểu tình trạng kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã phân lập và giám định thành công 26 chủng *S. agalactiae* từ ếch bệnh và chứng minh ếch bị bệnh mù mắt do *S. agalactiae* sau các phép thử sinh hóa, giám định bằng kỹ thuật PCR và cảm nhiễm thực nghiệm. Ếch bệnh đều có biểu hiện đặc trưng trắng đục mắt, mù một hoặc hai bên mắt, da sẫm màu, gan sưng, xuất huyết. Giá trị LD_{50} vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập từ ếch bệnh ở mức $1,2 \times 10^4$ - $3,5 \times 10^4$ CFU/ếch. Kháng sinh amoxicillin, florfenicol, erythromycin có tỷ lệ nhạy cao đối với vi khuẩn *S. agalactiae*, trong khi đó mức kháng cao kháng cao với các loại oxytetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của các hộ nuôi ếch tại các tỉnh đã tạo điều kiện thu mẫu để hoàn thành nghiên cứu này. Nghiên cứu được thực hiện dưới sự tài trợ của Học viện Nông nghiệp Việt Nam với mã số đề tài T2022 - 14 - 52.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Austin B., Austin D.A. & Munn C. (2007). Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. Springer. 26.
- Bauer A. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J clin pathol. 45: 149-158.
- Buller, N. B. Bacteria and Fungi from Fish and other Aquatic Animals, 2nd Edition: A Practical

Identification Manual, In: CABI, editors. CAB books. 919p.

CLSI (2016). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. 3rd Ed. CLSI guideline M45. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute..

CLSI (2020). Performance Standards for Antimicrobial Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals. 3rd Ed. CLSI supplement VET04. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Đặng Thị Hoàng Oanh & Nguyễn Thanh Phương (2012). Phân lập và xác định đặc điểm của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* từ cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.) bệnh phù mắt và xuất huyết. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. tr. 203-212.

Đặng Thị Hoàng Oanh, Nguyễn Đức Hiền & Trương Quỳnh Như (2012). Phân lập và xác định khả năng gây bệnh xuất huyết trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*) của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. (22c): 194-202.

Deer D., Lampel K. & González-Escalona N. (2010). A versatile internal control for use as DNA in real-time PCR and as RNA in real-time reverse transcription PCR assays. Letters in applied microbiology. 50(4):366-372.

Hoài T.D., Trang T.T., Tuyen N.V., Giang N.T.H. & Van K.V. (2019). *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in channel catfish in Vietnam. Aquaculture. 513: 734425.

Kim Văn Vạn & Trương Đình Hoài. (2021). Tác nhân gây bệnh đốm đỏ mắt ở cá trắm đen (*Mylopharyngodon piceus*) và kết quả điều trị. Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y. 6(18): 52-58.

Lưu Thị Thanh Trúc, Nguyễn Hữu Thịnh, Nguyễn Hoàng Nam Kha, Trần Hồng Thủy, Trần Ngọc Thiên Kim, Võ Văn Tuấn, Võ Thị Thanh Bình, Nguyễn Thùy Linh, Phạm Thị Lan Phương & Lê Thị Ngọc Hân (2008). Nghiên cứu những bệnh thường gặp trên ếch (*Rana tigerina*) nhập từ Thái Lan nuôi ở vùng ven đô thị thành phố Hồ Chí Minh. Báo cáo nghiệm thu đề tài nghiên cứu khoa học cấp sở, Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh.

Nguyễn Công Tráng & Nguyễn Bảo Duy. (2020). Hiện trạng dịch bệnh trên ếch Thái Lan (*Rana tigerina*) nuôi tại tỉnh Tiền Giang và tỉnh Đồng Tháp. Tạp chí Khoa học Đồng Tháp. 9: 109-116.

Nguyễn Ngọc Phước, Nguyễn Thị Huê Linh & Nguyễn Thị Xuân Hồng. (2020). Phân lập và xác định đặc điểm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh

- trên ếch Thái Lan tại Thừa Thiên - Huế. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. 377: 58-65.
- Omoniyi L., Ajibola M. & Jo B. (2012). Demand Analysis for Frog Meat in Ondo State, Nigeria. International Journal of Science and Research. 12: 9-12.
- Reed L.J. H.M. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Taylor & Francis.
- Salvador R., Muller E.E., Freitas J.C.d., Leonhardt J.H., Pretto-Giordano L.G. & Dias J.A. (2005). Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. Ciência Rural. 35:1374-1378.
- Somsiri T. & S. Soontornvit. (2002). Bacterial diseases of cultured tiger frog (*Rana tigerina*). Paper presented at the Diseases in Asian aquaculture IV: Proceedings of the Fourth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 22-26 November 1999, Cebu City, Philippines.
- Trương Đình Hoài, Nguyễn Vũ Sơn, Nguyễn Thị Hoài, Nguyễn Thị Mai Phương & Nguyễn Thị Hậu (2014). Đặc điểm mô bệnh học của cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) nhiễm *Streptococcus* sp. nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. Tạp chí Khoa học và Phát triển. 12(3): 360-371.
- Xie Z.Y., Zhou Y.C., Wang S.F., Mei B., Xu X.D., Wen W-Y. & Feng Y.Q. (2009). First isolation and identification of *Elizabethkingia meningoseptica* from cultured tiger frog, *Rana tigerina rugulosa*. Veterinary microbiology. 138(1-2):140-144.