

VỊ TRÍ PHÂN LOẠI VÀ ĐỘC LỰC CỦA CÁC CHỦNG *STREPTOCOCCUS INIAE* PHÂN LẬP TỪ CÁ CHỀM NUÔI TẠI KHÁNH HÒA

Đặng Thanh Hiền, Hứa Việt Cường, Vũ Khắc Hùng
Phân viện Thú y miền Trung

TÓM TẮT

Từ 163 mẫu cá bệnh nghi nhiễm *Streptococcus*, chúng tôi đã phân lập được 142 chủng vi khuẩn, được xác định là *S. iniae* bằng phương pháp PCR. Kết quả giải trình tự gen *16S rRNA* của 3 chủng *S. iniae* phân lập tại Khánh Hòa năm 2018, 2019 và 2020 cho thấy các chủng vi khuẩn này có mức tương đồng là 98,42% - 99,86% so với các chủng *S. iniae* trên GenBank. Kết quả kiểm tra 3/3 chủng *S. iniae* phân lập này đều có độc lực cao, gây chết cá trong khoảng thời gian 24-72 giờ. Từ kết quả xác định những đặc tính tương đồng của *Streptococcus* trên cá chêm nuôi ở tỉnh Khánh Hòa, chúng tôi có thể sử dụng các chủng vi khuẩn phân lập được này cho những nghiên cứu tiếp theo về nghiên cứu sản xuất vaccin phòng bệnh *S. iniae* trên cá chêm.

Từ khóa: Phân lập, hình thái, độc lực, *S. iniae*, cá chêm (*Lates calcarifer*).

Classification position and virulence of *Streptococcus iniae* strains isolated from seabass raising in Khanh Hoa province

Dang Thanh Hien, Hua Viet Cuong, Vu Khac Hung

SUMMARY

From 163 seabass samples suspecting *Streptococcus* infection, we identified 142 bacterial strains, they were determined to be *Streptococcus iniae* by using PCR method. The result of sequencing *16S rRNA* gene of three *S. iniae* isolated strains in Khanh Hoa in 2018, 2019 and 2020 showed that similarity level of these bacteria strains was 98.42% - 99.86% compared to *S. iniae* in the GenBank. The 3/3 isolated strains carried high virulence, killed 100% the experimental fish (*Lates calcarifer*) within 24-72 hours. This studied result can be used for further researchs on developing vaccines against *S. iniae* in seabass.

Keywords: Isolation, morphology, virulence, *S. iniae*, sea bass (*Lates calcarifer*).

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Giá trị thương phẩm cao, thị trường tiêu thụ rộng lớn và là loài phân bố rộng, dễ nuôi, tốc độ tăng trưởng nhanh đã làm cho cá chêm trở thành một trong những đối tượng được lựa chọn để phát triển nuôi chính cho ngành nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, nghề nuôi cá biển nói chung và cá chêm nói riêng ở nhiều nước trên thế giới cũng như Việt Nam đang phải đối mặt với những thách thức không nhỏ từ dịch bệnh. Trong số đó, dịch bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Streptococcus* gây ra ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành công nghiệp cá chêm, trong đó sự sụt giảm sản lượng, trung bình từ 8-15%, đôi khi có thể lên đến 70% (Bromage *et al.*, 1999). Trong nhóm vi khuẩn này, *S. iniae* gây bệnh trên nhiều loài cá nước ngọt và cá nước mặn.

Một số nghiên cứu gần đây đã tìm thấy ít nhất 27 loài cá nuôi và tự nhiên đã nhiễm bệnh do vi khuẩn *S. iniae* (Agnew và Barnes, 2007). *S. iniae* lần đầu tiên được phát hiện vào năm 1976 trên cá heo nước ngọt Amazon (*Inia geoffrensis*) ở San Francisco và New York, sau đó lần lượt được tìm thấy ở các nước Israel, Úc và Mỹ trên cả cá nước ngọt và cá nước mặn (Bromage *et al.*, 1999). Trên cá chêm *Lates calcarifer*, bệnh do *S. iniae* được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1999 tại Úc, sau đó bệnh tiếp tục xuất hiện trên cá chêm nuôi tại Úc năm 2006, tại Thái Lan năm 2010, và đến năm 2013 bệnh lần đầu tiên được báo cáo tại Việt Nam (Trương Thị Hoa và cs., 2018) với tỷ lệ gây chết cao, gây tổn thất kinh tế nghiêm trọng. Cá bệnh bị xuất huyết trên da, mất lông đục và xuất huyết, xoang bụng tích dịch, não xuất huyết.

Vì vậy, nghiên cứu đặc điểm sinh học của các chủng *S. iniae* phân lập được trên cá chẽm, kết hợp với xác định vị trí phân loài dựa vào trình tự rDNA 16S và độc lực của vi khuẩn này là cơ sở khoa học quan trọng để có chủng giống chuẩn cho các nghiên cứu và phát triển vacxin phòng bệnh hiệu quả giúp phát triển nghề nuôi cá chẽm tại Việt Nam trong tương lai.

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

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Mẫu cá chẽm nghi nhiễm *Streptococcus* tại Cam Ranh, Nha Trang và Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa từ tháng 8 năm 2018 đến tháng 12 năm 2020. Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm bộ môn Công nghệ sinh học, Phân viện Thú y miền Trung.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập vi khuẩn từ cá chẽm nghi nhiễm *Streptococcus* tại Cam Ranh, Nha Trang và Ninh Hòa
- Định danh và xác định tỷ lệ nhiễm *S. iniae* bằng phản ứng PCR
- Phân tích phả hệ *S. iniae* phân lập
- Xác định độc lực của các chủng *S. iniae* phân lập được.

2.3. Nguyên liệu

- Cá chẽm nghi mắc bệnh do *Streptococcus* từ các trại nuôi tại Cam Ranh, Nha Trang và Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa
- Môi trường nuôi cấy phân lập vi khuẩn *Streptococcus*: TSA, TSB, Thạch máu,...
- Mồi và các sản phẩm ứng dụng trong phản ứng PCR (bảng 1).

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phân lập vi khuẩn

Phương pháp lấy mẫu: Mẫu cá nghi nhiễm *Streptococcus* được thu thập, bảo quản trong thùng lạnh 2-8°C và chuyển về phòng thí nghiệm bộ môn Công nghệ sinh học, Phân viện Thú y miền Trung trong ngày để phân tích.

Phương pháp phân lập vi khuẩn: Mẫu bệnh phẩm (gan, lách, não) được ria cấy mẫu lên môi trường thạch máu và TSA bổ sung thêm 1,5% NaCl; nuôi cấy vi khuẩn ở 28°C trong vòng 24 - 48h. Vi khuẩn được kiểm tra các đặc điểm về hình thái, nhuộm gram và các đặc tính sinh lý sinh hóa đặc trưng của vi khuẩn *S. iniae* (Saleh và cs., 2017).

Các chủng vi khuẩn sau khi phân lập và được làm thuần sẽ được bảo quản ở nhiệt độ -80°C trong môi trường TSB bổ sung 30% glycerol.

2.4.2. Phương pháp định danh *S. iniae*

Các chủng vi khuẩn sau khi được phân lập, làm thuần và chọn lọc sơ bộ qua các đặc điểm hình thái, sinh lý sẽ được định danh bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu, trình tự cặp mồi được trình bày bảng 1 và thành phần phản ứng được thể hiện ở bảng 2 (Saleh và cs., 2017). Chu trình nhiệt cho phản ứng gồm giai đoạn biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút, sau đó là 30 chu kỳ gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, bắt cặp mồi ở 55°C trong 30 giây và tổng hợp ở 72°C trong 30 giây. Giai đoạn kéo dài ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di trên gel agarose 1,2% trong dung dịch TBE (Tris-base, EDTA, acid boric), gel sau đó được nhuộm bằng ethidium bromide, kết quả được đọc bằng hệ thống máy đọc gel.

Bảng 1. Cặp mồi sử dụng trong phản ứng PCR

Tên cặp mồi	Trình tự mồi (5'-3')	Gen đích	Kích cỡ (bp)	Tài liệu tham khảo
16F27	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA	1.500	Bayane và cs. (2006)
16R1522	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA			
Sin-1b	CTAGAGTACACATGTAGCTAAG	16S rRNA	300	Saleh và cs. (2017)
Sin-2b	GGATTTTCCACTCCCATAC			

Bảng 2. Thành phần của phản ứng PCR

Thành phần phản ứng	Thể tích (μl)
Nước (free RNA)	9,5
2X Reaction (2x My Taq Mix, Biorline)	12,5
Mồi xuôi	0,5
Mồi ngược	0,5
DNA	2
Tổng	25

2.4.3. Giải trình tự và phân tích đặc điểm di truyền vi khuẩn *S. iniae*

Vi khuẩn *S. iniae* được khuếch đại và giải trình tự gen *16S rRNA* sử dụng cặp mồi 16F27 và 16R1522 (Bayane và cs., 2006), chiều dài đoạn gen khuếch đại 1.500bp. Trình tự nucleotide trên gen *16S rRNA* được giải mã và xử lý bằng phần mềm BioEdit (phiên bản 7.2.5). Trình tự gen *16S rRNA* được so sánh với trình tự nucleotide gen *16S rRNA* của các chủng *S. iniae* tham chiếu trên GenBank bằng phần mềm Blast. Phân tích phả hệ bằng phần mềm Mega (phiên bản 10.1.8) dựa trên phương pháp Maximum likelihood. Độ tin cậy được kiểm tra bằng bootstrap với 1000 lần lặp lại.

2.4.4. Xác định độc lực vi khuẩn

Cá thí nghiệm có chiều dài từ 7 – 10 cm, khối lượng từ 10 – 15 g/con khỏe mạnh và được kiểm tra không nhiễm ký sinh trùng, vi khuẩn bằng phương pháp nhuộm soi tươi mang và nhuộm gram nội quan. Cá được nuôi trong hệ thống bể nhựa chứa nước biển và được cung cấp oxy. Nhiệt độ của bể trong thời gian thí nghiệm là khoảng 28°C. Tất cả cá được nuôi trong điều kiện thí nghiệm 14 ngày để quen với môi trường trước khi tiến hành thí nghiệm.

Chọn 1 khuẩn lạc vi khuẩn *S. iniae* trên môi trường TSA có bổ sung 1,5% NaCl nuôi cấy tăng sinh trong 20 mL TSB (Tryptone Soya Broth) bổ sung 1,5% NaCl; ủ lắc ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Tiến hành ly tâm 3000 vòng/phút trong 4 phút, loại bỏ phần dung dịch nổi và thu phần vi khuẩn, sau đó bổ sung PBS tạo dung dịch huyền phù với giá trị OD (Optical Density) ở bước sóng 610 nm bằng 1. Lấy dịch huyền phù này tiến hành pha loãng từ 10^{-2} đến 10^{-7} và xác định mật độ vi khuẩn.

Thí nghiệm được bố trí trong hệ thống bể nhựa, mỗi bể có thể tích 80L chứa 50L nước biển sạch có sục khí. Bố trí 1 thí nghiệm thức với 1 chủng vi khuẩn, mỗi thí nghiệm thức bố trí 1 bể với 10 cá chẽm. Tiêm 0,1 mL dịch huyền phù mỗi chủng vi khuẩn với mật độ 10^9 CFU/mL vào xoang bụng của cá. Thí nghiệm thức đối chứng tiêm 0,1 mL nước muối sinh lý. Cá thí nghiệm và đối chứng được theo dõi trong 7 ngày và cá chết được mổ khám và phân lập lại vi khuẩn từ não, gan và thận cá trên môi trường thạch máu và TSA bổ sung thêm 1,5% NaCl. Những chủng vi khuẩn gây chết cá trong 3 ngày được xem là những chủng có độc lực (Trương Thị Hoa và cs., 2018).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

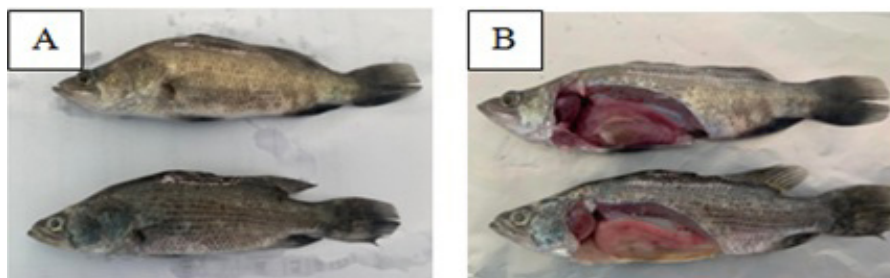
3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Streptococcus iniae* từ cá nghi mắc bệnh

Chúng tôi đã tiến hành thu 163 mẫu cá nghi ngờ nhiễm *Streptococcus* spp. có các dấu hiệu bệnh lý đặc trưng như thân đen, mắt cá lồi và đục, xuất huyết ở các gốc vây và xương nắp mang, cá mất thăng bằng, bơi lội không bình thường. Kết quả ở bảng 3 cho thấy, tổng số 163 mẫu cá chẽm có triệu chứng nghi mắc bệnh do *Streptococcus* spp., có 142 mẫu xuất hiện vi khuẩn thuần sau 24 - 36 h ủ ở nhiệt độ 28°C. Vi khuẩn phân lập được đều là các tế bào vi khuẩn gram dương, dạng chum, chuỗi hoặc đơn cầu (hình 2). Cơ quan đích chúng tôi sử dụng để phân lập vi khuẩn chủ yếu là não, thận, lách; môi trường phân lập là TSA có bổ sung thêm 5% máu thỏ trong điều kiện hiếu khí 28°C sau 48 giờ. Phương pháp này đã được nhiều tác giả sử dụng để phân lập vi khuẩn *S. iniae* đem lại hiệu quả phân lập cao. Figueiredo và cs. (2012) đã phân lập vi khuẩn *S. iniae* từ mẫu não, thận cá nghi nhiễm trên môi trường dinh dưỡng có bổ sung 5% máu, 28°C, 72 giờ. Hosam và cs. (2017) cũng phân lập *S. iniae* từ gan, thận, lách, mang cá trên môi trường TSA.

Từ 142 mẫu cá phân lập được *Streptococcus* spp., chúng tôi nhận thấy tỷ lệ xuất huyết nắp mang, xuất huyết da và tỷ lệ đen thân là 100%; tỷ lệ mất lồi từ 69,2% đến 91,7%; và vỡ mắt chiếm tỷ lệ thấp chỉ khoảng từ 8,3 đến 23,1% (bảng 3). Điều này phù hợp với nhận định của một số tác giả khác trên thế giới về đặc điểm bệnh do *S. iniae* gây ra trên cá. Nghiên cứu của Bromage và cs. (1999) đã ghi nhận những biểu hiện bệnh *S. iniae* gây ra trên cá chẽm là

thân cá chuyển đen, cá có cá dấu vết xuất huyết lan rộng, lở loét, mắt cá lồi đục. Theo Rahmatutalhi và cs. (2017), cá rô phi bị bệnh xuất huyết do vi khuẩn

S. iniae gây ra cũng có các dấu hiệu như trên. Dấu hiệu xuất huyết và mắt lồi đục được xem là dấu hiệu bệnh lý đặc trưng gây ra bởi loài vi khuẩn này.



Hình 1. Sự khác nhau giữa cá khỏe và cá bệnh

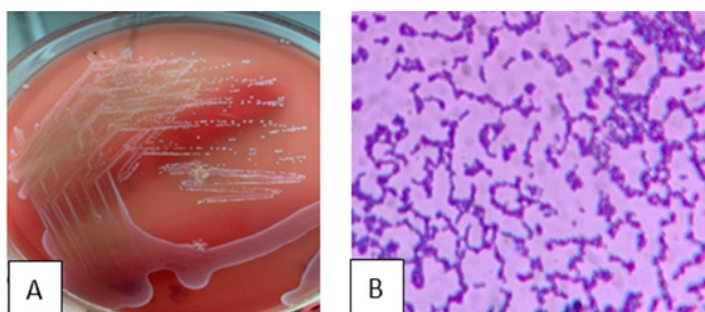
A: Cá khỏe (trên) có thân trắng và cá bệnh (dưới) có thân đen, B: Cá khỏe (trên) có gan màu đỏ tươi và cá bệnh (dưới) xuất huyết gan.

Bảng 3. Kết quả phân lập vi khuẩn *S. iniae* từ cá nghi mắc bệnh

Địa điểm thu mẫu	Số cá xét nghiệm (con)	Số cá dương tính (con)	Tỷ lệ dương tính (%)	Triệu chứng thể hiện trên cá nghi nhiễm vi khuẩn <i>S. iniae</i>				
				Mắt lồi (%)	Vỡ mắt (%)	Đen thân (%)	Xuất huyết nắp mang (%)	Xuất huyết da (%)
Cam Ranh	40	35	87,5	69,2	23,1	100	100	100
Nha Trang	57	47	82,4	85,7	14,3	100	100	100
Ninh Hòa	66	60	90,9	91,7	8,3	100	100	100
Tổng cộng	163	142	87,1	82,6	15,2	100	100	100

Sau khi phân lập, các chủng vi khuẩn được xác định đặc tính sinh hóa theo các tài liệu nghiên cứu từ trước về đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *S. iniae* trên thế giới như Pier và Madin (1976), Brenner và cs. (2005), Hosam và cs. (2017). Các vi khuẩn chúng tôi phân lập được đều có các đặc tính sinh

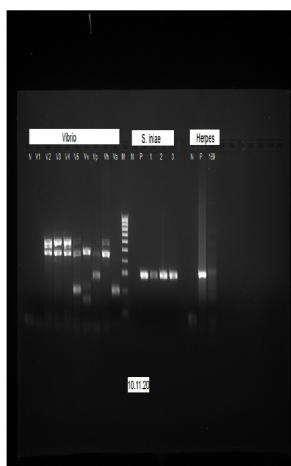
hóa cơ bản như: Gram dương, catalase âm, oxydase âm. Vi khuẩn phát triển tốt trên môi trường TSA có bổ sung thêm 5% máu thỏ trong điều kiện hiếu khí 28°C sau 24h-48h, khuẩn lạc nhỏ, có màu trắng đục, bề mặt trơn láng và vi khuẩn có khả năng dung huyết dạng β trên môi trường thạch máu (hình 2A).



Hình 2. Hình thái vi khuẩn *S. iniae*

A: Hình thái khuẩn lạc *S. iniae* trên môi trường thạch máu có bổ sung thêm 5% máu, B: *S. iniae* sau khi nhuộm gram và soi dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 100X

3.2. Kết quả định danh vi khuẩn



Hình 3. Sản phẩm PCR khuếch đại gen đặc hiệu *S. iniae* trên gel agarose 1,2%

M: Thang đo, N: Đối chứng âm, P: Đối chứng dương, 1-3: Mẫu

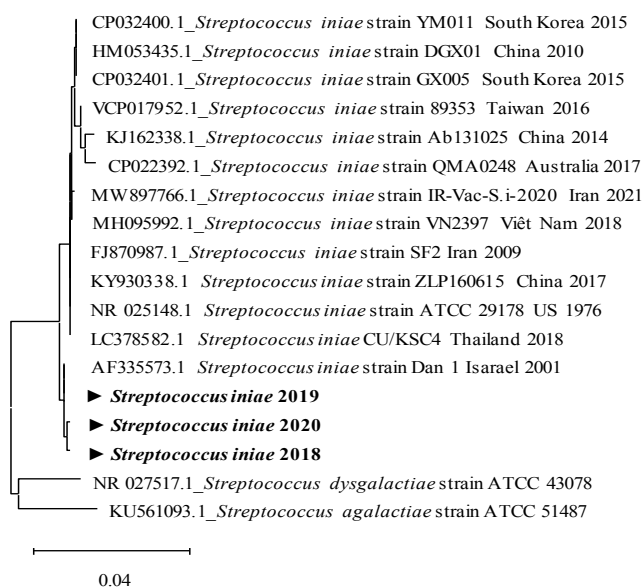
Tất cả 142 chủng vi khuẩn sau khi được phân lập đều được giám định bằng phản ứng PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu. Kết quả giám định PCR cho thấy 142/142 chủng vi khuẩn (100%) được xác định là *S. iniae*. Các chủng dương tính có chiều dài đoạn gen khuếch đại tương đương với chiều dài đoạn gen đích của cặp mồi đặc hiệu được sử dụng, các băng vạch đều đặc hiệu (300bp) (hình 3). Sasibha và cs.

(2014) cũng sử dụng cặp mồi đặc hiệu này nhân lên đoạn gen 300bp để xác định tỷ lệ nhiễm *S. iniae* trên cá rô phi phân lập tại Thái Lan từ năm 2003-2011. Phương pháp này cũng được nhiều tác giả sử dụng để định danh vi khuẩn *S. iniae* (Hosam và cs., 2017; Bin Park và cs., 2016).

3.3. Kết quả giải trình tự

Từ 142 chủng vi khuẩn phân lập được, chúng tôi lựa chọn 3 chủng có hình thái đặc trưng, khả năng sinh trưởng phát triển tốt, được phân lập trong 3 năm 2018 đến 2020 để giải trình tự và phân tích cây phả hệ gen *16S rRNA*. Gen *16S rRNA* được nhân lên đoạn gen có kích thước 1.500bp với cặp mồi 16F27 và 16R1522 (Bayane và cs., 2006). Kết quả giải trình tự *16S rRNA* của 3 chủng vi khuẩn phân lập từ cá chẻm cho thấy cả 3 chủng vi khuẩn phân lập tại Khánh Hòa trong 3 năm 2018, 2019 và 2020 tương đồng 99,86% và các chủng phân lập tương đồng 98,42% - 99,86% với các chủng vi khuẩn *S. iniae* tham chiếu ATCC 29178 và chủng công bố trên Ngân hàng Gen.

Khi phân tích cây phả hệ gen *16S rRNA* cho thấy chủng *S. iniae* phân lập được trên cá chẻm cùng nhóm với chủng vi khuẩn *S. iniae* trên Ngân hàng Gen. Trong khi đó, chủng có nguồn gốc di truyền gần gũi với *S. agalactiae* và *S. dysagalactiae* thuộc nhóm hoàn toàn khác (hình 4).



Hình 4. Cây phả hệ gen 16S rRNA của 3 chủng vi khuẩn *S. iniae* phân lập

3.4. Kết quả xác định độc lực của các chủng *S. iniae* phân lập

Tiêm 0,1 mL dịch huyền phù mỗi chủng vi khuẩn với mật độ 10^9 CFU/mL vào xoang bụng của cá. Cá thí nghiệm bắt đầu xảy ra hiện tượng chết sau khi tiêm vi khuẩn vào xoang bụng 20h. Số lượng cá chết tăng mạnh vào ngày thứ 2, đến ngày thứ 3 thì 100% cá thí nghiệm chết. Dấu hiệu bệnh lý của cá thí nghiệm cũng thể hiện tương tự như cá nhiễm ở ngoài tự nhiên. Cá hấp hối thường chuyển màu đen sậm và bơi lội bất thường. Tuy nhiên vẫn có một số cá thí nghiệm chết mà không thể hiện dấu hiệu bệnh lý. Kết quả phân lập vi khuẩn từ cá thí nghiệm đã thu được vi khuẩn thuần khiết ở não, gan và thận cá. Không có bất kỳ hiện tượng chết nào xảy ra ở các nghiệm thức đối chứng.

IV. KẾT LUẬN

- Tỷ lệ phân lập *S. iniae* từ cá chẽm nghi mắc bệnh là 87,1%.

- 100% vi khuẩn *S. iniae* phân lập được định danh bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu.

- Kết quả so sánh trình tự gen *16S* của 3 chủng *S. iniae* phân lập tại Khánh Hòa trong năm 2018; 2019 và 2020 tương đồng 99,86% và các chủng phân lập tương đồng 98,42% - 99,86% với các chủng vi khuẩn *S. iniae* tham chiếu ATCC 29178 và chủng công bố trên Ngân hàng Gen.

- 3/3 chủng *S. iniae* phân lập gây chết 100% cá trong khoảng thời gian 24-72 giờ. 3 chủng *S. iniae* phân lập có độc lực cao là nguồn gen quý cho công tác nghiên cứu và là chủng giống phục vụ phát triển vaccine phòng bệnh *S. iniae* trên cá chẽm trong nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Trương Thị Hoa, Nguyễn Ngọc Phước và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2018. Nghiên cứu đặc điểm bệnh học của vi khuẩn *Streptococcus iniae* trên cá chẽm (*Lates calcarifer*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 54(3B): 156-163.
- Agnew, W and A.C. Barnes, 2007. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*. 122: 1-15.
- Bayane A, Dominique R, Robin DD, Jacqueline D, Brehima D, Philippe T., 2006. Assessment of the physiological and biochemical characterization of a *Lactic acid bacterium* isolated from chicken faeces in sahelian region. *Afr. J. Biotechnol.* 5(8):629-634.
- Bin Park S., Nho S.W., Bin Jang H., Cha I.S., Kim M.S., Lee W.J., Jung T.S., 2016. Development of three-valent vaccine against streptococcal infections in olive flounder. *Paralichthys olivaceus. Aquaculture*. 461:25-31.
- Brenner D.J., Krieg N.R., Garrity G.M. and Staley J.T., 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2: The proteobacteria, New York, Springer
- Bromage, S. E, A. Thomas and L. Owens, 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Disease of aquatic Organisms*. 36: 177-181.
- Figueiredo, H. C. P., Nobrega Netto, L., Leal, C.A. G., Pereira, U. P., and Mian, G. F., 2012. *Streptococcus iniae* outbreaks in Brazilian Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) farms. *Braz. J. Microbiol.* 43, 576-580.
- Hosam A. Saleh, Nader M. Sabry, Mohamed Abd Al-Razik, Fatma A.S. Mohamed, Madiha S. Ibrahim, 2017. Pathogenicity and characterization of Streptococcosis in Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Kafr Elshikh Governorate. *AJVS*. 52(1): 173-179.
- Jantrakajorn, S., Lukkana, M., & Wongtavatchai, J., 2014. Serological and molecular characterization of *Streptococcus iniae* in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 44(1), 49-58.
- Pier GB, Madin SH, 1976. *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *Int J Syst Bacteriol* 26:545-53.
- Rahmatullah, M., Ariff, M., Kahieshesfandiari, H.M., Daud, M., Zamri-Saad, M.Y., Sabri, M.N.A., Amal, M.Y. Ina-Salwany. 2017. Isolation and pathogenicity of *Streptococcus iniae* in cultured Red hybrid tilapia in Malaysia. *J. Aquat. Anim. Health*. 29, 208-213.
- Saleh, H. A., Sabry, N. M., Abd Al-Razik, M., Mohamed, F. A., & Ibrahim, M. S., 2017. Pathogenicity and characterization of *Streptococcosis* in Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Kafr Elshikh Governorate. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 52(1), 173-179.

Ngày nhận 4-4-2022

Ngày phản biện 6-5-2022

Ngày đăng 1-7-2022