Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
website: sj.ctu.edu.vn

DOI:10.22144/ctu.jvn.2016.549

PHÁT HIỆN NHANH *Streptococcus agalactiae* VÀ *Streptococcus iniae* TỪ MẪU MÔ CÁ BẰNG KỸ THUẬT DUPLEX PCR

Trần Thị Tuyết Hoa, Nguyễn Trang Huyền và Hồng Mộng Huyền
Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:
Ngày nhận: 23/04/2016
Ngày chấp nhận: 26/10/2016

Title:
Rapid detection of Streptococcus agalactiae and Streptococcus iniae from fish tissue by duplex polymerase chain reaction

Từ khóa:
Mô cá, PCR, phát hiện, Streptococcus agalactiae, Streptococcus iniae

Keywords:
Detection, fish tissue, PCR, Streptococcus agalactiae, Streptococcus iniae

ABSTRACT

This research was conducted to develop a duplex PCR assay that could simultaneously detect Streptococcus agalactiae and Streptococcus iniae, two causative agents of Streptococcosis on both of freshwater and brackishwater fish. The duplex-PCR amplified partial lactate oxidase (*lctO) and 16s rRNA genes of S. iniae and S. agalactiae at 870 bp and 220 bp, respectively. Results showed that (i) the PCR reaction consists of the following components 1 X PCR buffer; 2 mM $MgCl_2$; 250 µM dNTPs; 10 pm F1 and IMOD primers; 5 pm LOX-1 and LOX-2 primers; 1,0 U Taq polymerase, 1 µl S. agalactiae extracted DNA; 1 µl S. iniae extracted DNA, total reaction volume of 25 µl and (ii) the PCR cycle consists of 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 1 min, 57°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final elongate step at 72°C for 7 min. The detection limits of the duplex PCR were in the range of 10^0 cfu/ml and 10^3 cfu/ml for S. agalactiae and S. iniae, respectively. The duplex PCR did not produce any specific amplification products when tested against Edwardsiella ictaluri, Aeromonas hydrophila, Vibrio harveyi và Vibrio parahaemolyticus.*

TÓM TẮT

Nghiên cứu thực hiện nhằm phát triển quy trình duplex PCR phát hiện đồng thời hai loài vi khuẩn S. agalactiae và S. iniae gây Streptococcosis trên cá nước ngọt và mặn. Quy trình khuếch đại sản phẩm dựa trên các gen lactate oxidase (*lctO) và 16s rRNA của S. iniae và S. agalactiae tương ứng tại 870 bp và 220 bp. Nghiên cứu xác định được: (i) thành phần hóa chất phản ứng bao gồm: 1 X PCR buffer; 2 mM $MgCl_2$; 250 µM dNTPs; 10 pm mồi F1; 10 pm mồi IMOD; 5 pm mồi LOX-1; 5 pm mồi LOX-2; 1,0 U Taq polymerase; 1 µL DNA S. agalactiae chiết tách; 1 µL DNA S. iniae chiết tách, tổng thể tích phản ứng là 25 µL và (ii) chu kỳ nhiệt cho phản ứng duplex PCR: 95°C trong 5 phút, tiếp theo 35 chu kỳ: 95°C trong 1 phút, 57°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút và cuối cùng 72°C trong 7 phút. Độ nhạy của quy trình được xác định đối với S. agalactiae là 10^0 cfu/mL và S. iniae là 10^3 cfu/mL. Qui trình duplex PCR không khuếch đại sản phẩm đặc hiệu khi kiểm tra với Edwardsiella ictaluri, Aeromonas hydrophila, Vibrio harveyi và Vibrio parahaemolyticus.*

Trích dẫn: Trần Thị Tuyết Hoa, Nguyễn Trang Huyền và Hồng Mộng Huyền, 2016. Phát hiện nhanh *Streptococcus agalactiae* và *Streptococcus iniae* từ mẫu mô cá bằng kỹ thuật duplex PCR. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 46b: 111-117.

1 GIỚI THIỆU

Đồng bằng sông Cửu Long được biết đến là vùng nuôi trồng thủy sản lớn nhất Việt Nam. Bên cạnh đối tượng nuôi chủ lực như cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*), nhóm cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.), cá rô đồng (*Anabas testudineus*), cá chẽm (*Lates calcarifer*) … cũng đang được người dân lựa chọn nuôi trong những năm gần đây. Với nhóm loài cá này, bệnh do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* và *Streptococcus iniae* là bệnh thường gặp trong quá trình nuôi (Phạm Hồng Quân *và ctv.*, 2013). Bệnh do *S. agalactiae* gây ra phổ biến hiện nay như bệnh phù mắt và xuất huyết trên cá điêu hồng (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012a), bệnh xuất huyết trên cá rô đồng (Đặng Thị Hoàng Oanh *và ctv*., 2012b), bệnh xuất huyết trên cá rô phi (Phạm Hồng Quân *và ctv.*, 2013), bệnh xuất huyết trên cá kèo nuôi ở Bạc Liêu (Nguyễn Thu Dung và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2013). Tương tự, bệnh do *S. iniae* đã được các nhà nghiên cứu ghi nhận trên ít nhất 27 loài cá nuôi và cá tự nhiên với tỷ lệ chết có khả năng gây ra dao động 50% - 90% (Agnew and Barnes, 2007). Ngoài ra, *S. iniae* được xác định là tác nhân gây bệnh xuất huyết trên cá chẽm nuôi ở Vũng Tàu (Nguyễn Bảo Trung *và ctv.,* 2013), bệnh đen thân trên cá rô đồng nuôi ở Hậu Giang (Từ Thanh Dung *và ctv.*, 2013) với tỉ lệ chết trên 50% gây thiệt hại kinh tế cho người nuôi. Do vậy, việc phát hiện sớm tác nhân gây các bệnh này trên cá trong quá trình nuôi là điều cần thiết.

Hiện nay, phương pháp phổ biến dùng để phát hiện vi khuẩn *S. agalactiae* và *S. iniae* trên cá bao gồm phương pháp sinh hóa truyền thống hoặc sử dụng bộ kit API 20Strep (BioMerieux), phương pháp polymerase chain reaction (PCR). Trong đó, phương pháp PCR, đặc biệt là phương pháp PCR đa mồi có thể đáp ứng nhu cầu thực tế bao gồm phát hiện nhanh, đơn giản và cho kết quả chính xác tác nhân gây bệnh.

Phát triển qui trình PCR đa mồi phát hiện đồng thời vi khuẩn *S. iniae và S. agalactiae* trực tiếp từ mẫu cá bị nhiễm khuẩn nhằm phát hiện chính xác vi khuẩn gây bệnh trong thời gian ngắn, góp phần quan trọng trong nghiên cứu phòng và trị bệnh cho cá, hạn chế rủi ro do dịch bệnh xảy ra trong quá trình nuôi cá ở vùng nước ngọt, lợ, mặn.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu vật dùng cho nghiên cứu bao gồm: (i) các chủng vi khuẩn *S. agalactiae*, *S. iniae và* mẫu DNA chiết tách từ các loài vi khuẩn: *Edwardsiella ictaluri, Aeromonas hydrophila, Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* từ bộ sưu tập mẫu vật của Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ; (ii) Cá rô đồng (trọng lượng 200 g/con) có dấu hiệu bệnh (xuất huyết, gan có đốm trắng, mắt đục, đen thân) thu từ ao nuôi để sử dụng kiểm tra khả năng ứng dụng qui trình.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chiết tách DNA

Vi khuẩn được nuôi tăng sinh (24-48 giờ) trong môi trường Brain heart infusion broth (BHIB - có hoặc không có bổ sung NaCl 0,85%) ở nhiệt độ 32ºC. Thể tích khoảng 1,5 ml dung dịch vi khuẩn sau khi nuôi tăng sinh được chuyển sang ống eppendorf mới có chứa sẵn 100 µl dung dịch TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Hỗn hợp đun nóng ở 95ºC trong 15 phút rồi làm lạnh nhanh trong nước đá. Sau đó ly tâm 14.000 vòng/phút trong 2 phút để tách DNA và trữ ở -20ºC cho đến khi sử dụng (Bartie *et al.,* 2006).

Chiết tách DNA từ mô thận cá được thực hiện bao gồm các bước: nghiền nhuyễn mẫu thận trong 100 µl PBS, thêm 10 µl lyzozyme (10 mg/ml), ủ mẫu ở 37ºC trong 30 phút. Sau đó, mẫu được thêm vào 10 µl Chelex - 100 resin, tiếp tục ủ mẫu ở 56°C trong 10 phút. Tiếp theo thêm vào 200 µl Trixton X-10 và ủ 100°C trong 10 phút. Làm lạnh mẫu trong nước đá, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 3 phút. Sau đó rút dịch nổi trữ ở 4°C cho đến khi sử dụng (Buller, 2004 có điều chỉnh bởi Trần Thị Tuyết Hoa *và ctv*., 2014).

Hàm lượng DNA chiết tách được xác định bằng phương pháp so màu quang phổ ở bước sóng 260 nm, 280 nm và chất lượng DNA chiết tách được đánh giá qua tỉ lệ 260/280 nm.

2.2.2 Phương pháp PCR phát hiện vi khuẩn S. agalactiae

Phương pháp PCR phát hiện vi khuẩn *S. agalactiae* được thực hiện theo qui trình bao gồm: (i) Thành phần hóa chất tham gia phản ứng bao gồm: 1X PCR buffer; 2 mM MgCl2; 250 µM dNTPs; 10 pm mồi F1; 10 pm mồi IMOD; 1 U Taq polymerase; 1 µl DNA chiết tách. (ii) Điều kiện phản ứng: 95ºC trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ gồm: 95ºC trong 1 phút, 58ºC trong 1 phút, 72ºC trong 1 phút và cuối cùng 72ºC trong 7 phút. Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu ở vị trí 220 bp (Channarong *et al.,* 2012 có điều chỉnh bởi Trần Thị Tuyết Hoa *và ctv.,* 2014). Trình tự mồi sử dụng cho phản ứng bao gồm: F1 (5’ GAG TTT GAT CAT GGG TCA G 3’); IMOD (5’ ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC 3’) (Channarong *et al.,* 2012); LOX-1 (5’- AAG GGG AAA TCG CAA

GTG CC -3'); LOX-2 (5'- ATA TCT GAT TGG GCC GTC TAA -3') (Mata *et al.,* 2004).

2.2.3 Phương pháp PCR phát hiện vi khuẩn S. iniae

Phương pháp PCR phát hiện vi khuẩn S. iniae được thực hiện theo qui trình của Mata *et al.* (2004) (có điều chỉnh bởi Ngô Minh Phương, 2014). Thành phần hóa chất tham gia phản ứng bao gồm: 1X PCR buffer; 2 mM $MgCl_2$; 250 µM dNTPs; 5 pm mồi LOX-1; 5 pm mồi LOX-2; 0,75 U Taq polymerase; 1 µl DNA chiết tách. Điều kiện phản ứng: 95°C trong 5 phút, tiếp theo 35 chu kỳ gồm: 95°C trong 1 phút, 52°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút và cuối cùng 72°C trong 7 phút. Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu ở vị trí 870 bp.

2.2.4 Phương pháp duplex PCR phát hiện đồng thời vi khuẩn S. agalactiae và vi khuẩn S. iniae

Quy trình duplex PCR phát hiện *S. agalactiae* và *S. iniae* với các cặp mồi F1/ IMOD (Channarong *et al*., 2012), LOX-1/LOX-2 (Mata *et al*., 2004). Thành phần hóa chất tham gia phản ứng dự kiến bao gồm: 1X PCR buffer; 2 mM $MgCl_2$; 250 µM dNTPs; 10 pm mồi F1; 10 pm mồi IMOD; 5 pm mồi LOX-1; 5 pm mồi LOX-2; 2,5 U Taq polymerase; 1 µl DNA *S. agalactiae* chiết tách; 1 µl DNA *S. iniae* chiết tách. Điều kiện phản ứng dự kiến bao gồm: 95°C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ: 95°C trong 1 phút, 54°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút và cuối cùng 72°C trong 7 phút. Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu hiện vạch ở vị trí 220 bp cho *S. agalactiae* và 870 bp cho *S. iniae*.

Chuẩn hóa quy trình: Các chỉ tiêu chuẩn hóa gồm nồng độ Taq DNA polymerase, nồng độ mồi, nhiệt độ gắn mồi và số chu kỳ nhiệt.

2.2.5 Xác định độ nhạy của phản ứng duplex PCR phát hiện S. agalactiae và S. iniae

Độ nhạy của phản ứng duplex PCR phát hiện *S. agalactiae* và *S. iniae* được thực hiện với các mẫu vi khuẩn ở các mức pha loãng lần lượt từ 10^7 xuống 10^0 cfu/ml. Các mẫu DNA sau khi pha loãng được chiết tách, khuếch đại với nồng độ hóa chất, chu kỳ nhiệt như qui trình đã được chuẩn hóa và sau đó điện di với gel agarose 1,5%. Độ nhạy của qui trình PCR là giới hạn thấp nhất (mật độ vi khuẩn thấp nhất) mà qui trình PCR có thể khuếch đại và phát hiện được vạch sản phẩm.

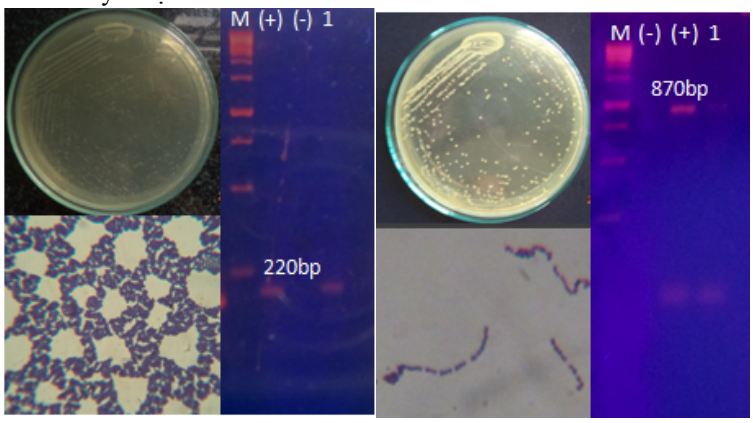
2.2.6 Xác định tính đặc hiệu của phản ứng duplex PCR phát hiện S. agalactiae và S. iniae

Tính đặc hiệu của phản ứng duplex PCR được thực hiện với 4 loài vi khuẩn thường được phát hiện trên các đối tượng nuôi thủy sản nước ngọt và lợ mặn bao gồm: *E. ictaluri, A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* với thành phần hóa chất và chu kỳ nhiệt của phản ứng duplex PCR sau khi chuẩn hóa.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Chuẩn hóa quy trình duplex PCR phát hiện đồng thời hai loài vi khuẩn *S. agalactiae* và *S. iniae*

Trước khi sử dụng cho qui trình chuẩn hóa, hai chủng vi khuẩn *S. agalactiae* và *S. iniae* được kiểm tra đặc tính hình thái, tái định danh với phương pháp PCR. Chủng *S. agalactiae* tạo khuẩn lạc tròn, lồi, màu kem, kích thước 1 mm và chủng vi khuẩn *S. iniae* tạo khuẩn lạc tròn, nhỏ, đường kính 1-2 mm. Cả hai chủng vi khuẩn đều cho kết quả hình cầu, Gram dương (Hình 1).



A **B**

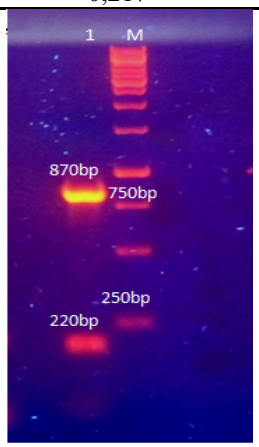
Hình 1: Hình khuẩn lạc, kết quả nhuộm Gram và kết quả PCR của hai chủng vi khuẩn nghiên cứu *S. agalactiae* (A) và *S. iniae* (B)

Kết quả điện di sản phẩm PCR ghi nhận (i) vạch 220 bp đặc hiệu cho *S. agalactiae* (Giếng 1- Hình 1A), và (ii) vạch 870 bp đặc trưng cho *S. iniae* (Giếng 1- Hình 1B). Do đó, hai chủng vi

khuẩn *S. agalactiae* và *S. iniae* này được chọn để sử dụng cho việc chuẩn hóa quy trình duplex PCR. DNA của vi khuẩn được chiết tách theo quy trình được trình bày ở mục 2.2.1. Kết quả nồng độ DNA chiết tách được trình bày trong Bảng 1, với nồng độ DNA đủ để sử dụng cho quá trình thử nghiệm qui trình.

Bảng 1: Nồng độ DNA của hai mẫu vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu

Mẫu	Giá trị đo ở 260 nm	Nồng độ DNA (µg/ ml)
S. agalactiae	0,207	1.035
S. iniae	0,217	1.085



Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện đồng thời *S. agalactiae* và *S. iniae*

Giếng M: Thang DNA 1kb plus, giếng 1:Mẫu vi khuẩn S. agalactiae và S. iniae

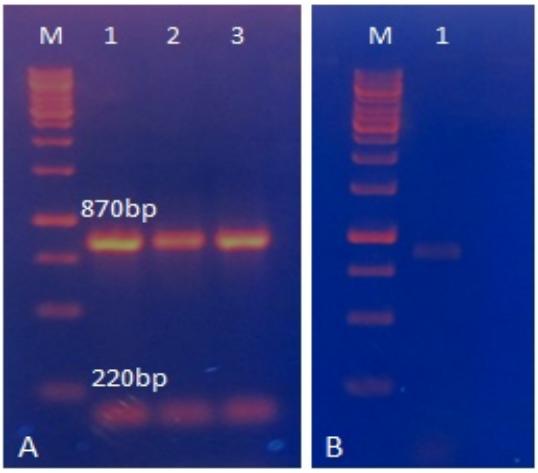
Quy trình duplex PCR phát hiện đồng thời *S. agalactiae* và *S. iniae* được thực hiện với thành phần hóa chất và điều kiện chu kỳ nhiệt như mục 2.2.3 và 2.2.4. Kết quả điện di sản phẩm PCR hiện vạch ở vị trí 220 bp đặc hiệu cho vi khuẩn *S. agalactiae* và 870 bp đặc hiệu cho vi khuẩn *S. iniae* (Hình 2). Tuy nhiên, để giảm chi phí cho qui trình, tiếp tục điều chỉnh các thành phần trong phản ứng nhưng vẫn duy trì tính ổn định và độ nhạy của qui trình.

3.2 Khảo sát nồng độ Taq DNA polymerase

Phản ứng duplex PCR được thực hiện với thành phần hóa chất tương tự mục 2.2.4, điều chỉnh nồng độ Taq DNA polymerase từ 2,5 U/phản ứng xuống 1,5 và 1 U/phản ứng. Kết quả ghi nhận ở hình 3A cho thấy, ở tất cả các lần tối ưu đều cho kết quả điện di hiện vạch sản phẩm 220 bp đặc hiệu cho *S. agalactiae* và 870 bp đặc hiệu cho *S. iniae*. Khi giảm nồng độ Taq DNA polymerase từ 2,5 U xuống 1,0 U cho kết quả tốt, vạch sản phẩm vẫn sáng, rõ nét và không xuất hiện vạch sản phẩm phụ (Giếng 3-Hình 3A). Do vậy, kết quả ghi nhận nồng độ Taq DNA 1.0 U là thích hợp cho phản ứng duplex PCR. Taq DNA polymerase là thành phần hóa chất quan trọng trong phản ứng PCR. Nồng độ Taq DNA polymerase quá cao (trên 4 UI/100 µl) sẽ tạo ra các vạch sản phẩm không đặc hiệu (Saiki, 1989 trích dẫn bởi Romalde *et al*., 2009). Nồng độ Taq DNA polymerase được chọn sau khi tối ưu là 1,0 U, nồng độ này cao hơn so với nghiên cứu của Channarong *et al*. (2012) là 0,75 U, tuy nhiên vẫn nằm trong giới hạn cho phép và khi điện di, vạch sản phẩm vẫn sáng và rõ nét.

3.3 Khảo sát nồng độ mồi

Quy trình tiếp tục được chuẩn hóa nồng độ mồi F1/IMOD (giảm nồng độ mồi F1/IMOD từ 10pm xuống 5 pm/phản ứng). Kết quả điện di cho vạch sản phẩm ở vị trí 870 bp nhưng rất mờ, không hiện vạch 220 bp, cho thấy nồng độ mồi 5 pm không đủ để cho quá trình khuếch đại tối ưu (Giếng 1- Hình 3C). Do vậy, kết quả ghi nhận nồng độ 10 pm thích hợp cho phản ứng. Trong phản ứng PCR, nồng độ mồi cần phải dưới 1 µM, nồng độ mồi quá cao có thể cho kết quả không đặc hiệu (Quyền Đình Thi và Nông Văn Hải, 2008). Khi giảm nồng độ mồi F1/IMOD xuống còn 5 pm cho kết quả điện di mờ, chỉ hiện vạch sản phẩm 870 bp cho *S. iniae*, cho thấy nồng độ này không đủ cung cấp cho phản ứng. Kết quả tương tự nghiên cứu của Dương Thành Long (2013) với nồng độ mồi F1/IMOD là 5 pm không đủ cung cấp cho phản ứng, tăng 10 pm cho kết quả vạch sản phẩm sáng hơn và không tạo ra sản phẩm không đặc hiệu.



Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm duplex PCR phát hiện *S. agalactiae* và *S. iniae*

A. Nồng độ Taq DNA giảm từ 2,5 U xuống 1,5 U và 1 U.

B. Nồng độ mồi F1/ IMOD giảm xuống 5 pm/ phản ứng.

Giếng M: Thang DNA 1kb plus, A.giếng 1: Mẫu DNA khuếch đại với nồng độ Taq DNA 2,5 U, giếng 2: nồng độ Taq 1,5 U và giếng 3: nồng độ Taq 1 U; B. Giếng 1: Nồng độ cặp mồi F1/ IMOD 5 pm/ phản ứng

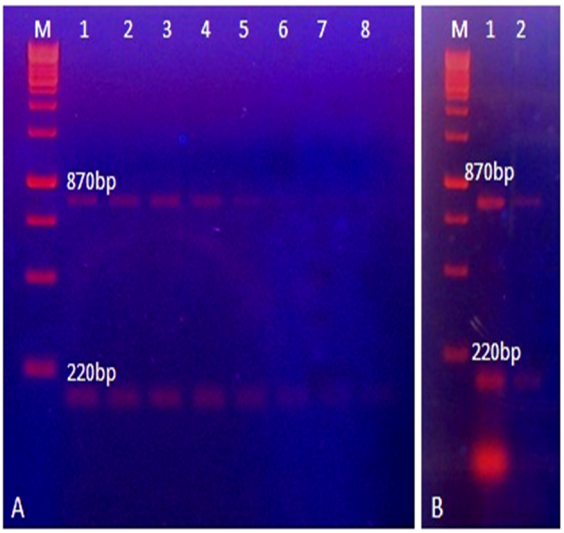
3.4 Khảo sát nhiệt độ gắn mồi

Khảo sát nhiệt độ gắn mồi ở các mức khác nhau, kết quả ghi nhận: (i) vạch đặc hiệu ở vị trí 870 bp cho mẫu khuếch đại *S. iniae* ở các nhiệt độ gắn mồi từ 59^{o}C đến 54,1^{o}C (Giếng 1-5. Hình 4A) và (ii) vạch đặc hiệu ở vị trí 220 bp cho mẫu khuếch đại *S. agalactiae* ở các nhiệt độ từ 59^{o}C đến 51,7^{o}C (Giếng 1-7. Hình 4A). Kết quả cho thấy vạch sản phẩm nhạt dần khi nhiệt độ gắn mồi giảm dần từ 59^{o}C xuống 52,7^{o}C, không còn thấy vạch sản phẩm đặc trưng của *S. iniae* ở nhiệt độ 51,7^{o}C, 51^{o}C (Giếng 6,7,8-Hình 4A) và của *S. agalactiae* ở nhiệt độ 51^{o}C (Giếng 8-Hình 4A). Vạch sản phẩm rõ nét và sáng nhất khi nhiệt độ gắn mồi ở 57,6^{o}C (Giếng số 2- Hình 4A). Kết quả cho thấy 57^{o}C là mức nhiệt độ gắn mồi phù hợp cho phản ứng duplex PCR.

Nhiệt độ gắn mồi thích hợp cho phản ứng duplex PCR phải đảm bảo thích hợp cho cả hai đoạn mồi, với nhiệt độ 57^{o}C thì hoàn toàn phù hợp và vạch sản phẩm sau khi điện di rất sáng và rõ nét so với các mức nhiệt độ còn lại. Khi nhiệt độ quá thấp, mồi sẽ bắt cặp với các trình tự khác trình tự mục tiêu, giảm hiệu suất sản phẩm đặc hiệu. Kết quả này tương tự với nghiên cứu Akkarawit *et al*. (2012), nhiệt độ gắn mồi 58^{o}C cho phản ứng mPCR phát hiện đồng thời ba loài vi khuẩn *S. agalactiae, S. iniae* và *Lactococcus garvieae*. Tương tự, Dương Thành Long (2013) khảo sát nhiệt độ gắn mồi của F1/IMOD (60^{o}C-50^{o}C), khi nhiệt độ gắn mồi giảm vạch sản phẩm sẽ mờ dần đến khi không hiện vạch.

3.5 Khảo sát số lượng chu kỳ nhiệt

Sau khi tối ưu các thành phần phản ứng và nhiệt độ gắn mồi, phản ứng duplex PCR tiếp tục được khảo sát chỉ tiêu số lượng chu kỳ nhiệt. Số lượng chu kỳ nhiệt được tăng từ 30 chu kỳ lên 35 chu kỳ. Kết quả điện di ở hình 4B cho thấy vạch sản phẩm ở 35 chu kỳ (Giếng 1- Hình 4B) sáng hơn rất nhiều lần so với 30 chu kỳ (Giếng 2- Hình 4B). Theo Trần Thị Xô và Nguyễn Thị Lan (2005) số lượng chu kỳ cho một phản ứng PCR thông thường trong khoảng từ 30 đến 40 chu kỳ. Bởi vì phản ứng diễn biến theo hai giai đoạn; ở giai đoạn đầu, số lượng bản sao tăng theo cấp số nhân và đến một giới hạn nào đó thì số lượng bản sao giảm, hiệu quả khuếch đại giảm. Do vậy, số lượng 35 chu kỳ nhiệt được sử dụng cho phản ứng duplex PCR phát hiện *S. agalactiae* và *S. iniae* là phù hợp, vẫn còn trong giới hạn cho phép.



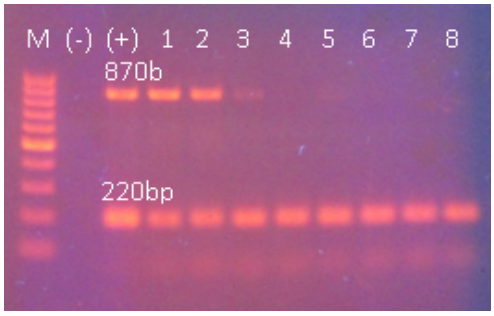
Hình 4: Kết quả điện di sản phẩm PCR khảo sát điều kiện phản ứng duplex PCR

A. Khảo sát nhiệt độ gắn mồi. B Khảo sát số lượng chu kỳ nhiệt từ 30 lên 35 chu kỳ

A.Giếng M: thang DNA 1kb plus, giếng 1: 59^{o}C, giếng 2: 58,6^{o}C, giếng 3: 57,6^{o}C, giếng 4: 56,2^{o}C, giếng 5:54,1^{o}C, giếng 6: 52,7^{o}C, giếng 7: 51,7^{o}C, giếng 8: 51^{o}C. B.Giếng M: Thang DNA 1kb plus, giếng 1: 35 chu kỳ, giếng 2: 30 chu kỳ

3.6 Kết quả xác định độ nhạy cho phản ứng duplex PCR

Quy trình duplex PCR sau khi chuẩn hóa xác định thành phần phản ứng, điều kiện chu kỳ nhiệt cho phép phát hiện đồng thời *S. agalactiae* và *S. iniae*, tiếp tục được xác định độ nhạy. Kết quả điện di cho thấy quy trình có thể phát hiện được vi khuẩn *S. agalactiae* với mật độ vi khuẩn thấp nhất là 10^0 cfu/ml (Giếng số 7-Hình 5), vạch DNA xuất hiện rất rõ cho các mật độ vi khuẩn thử nghiệm. Đối với vi khuẩn *S. iniae,* mật độ vi khuẩn thấp nhất phát hiện là 10^3 cfu/ml (Giếng số 5, Hình 5). Tuy nhiên, đối với *S. iniae* khi mật độ vi khuẩn 10^3 cfu/ml thì vạch sản phẩm sáng hơn so với mật độ vi khuẩn 10^4 cfu/ml. Từ kết quả trên cho thấy quy trình có độ nhạy phát hiện *S. agalactiae* cao hơn *S. iniae*. Độ nhạy của phản ứng đối với *S. agalactiae* là 10^0 cfu/mL. Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của Martinez *et al.* (2001) khi phát hiện vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* với độ nhạy ở mật độ 10^2 cfu/mL sữa. Độ nhạy của quy trình phát hiện *S. iniae* là 10^3 cfu/ml, tuy nhiên kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu Mata *et al.* (2004) và Fadaeifard *et al*. (2012) khi phát hiện *S. iniae* gây bệnh trên cá hồi.



Hình 5: Kết quả điện di xác định độ nhạy của phản ứng duplex PCR phát hiện *S. agalactiae* và *S. iniae*

Giếng M: thang DNA 100bp, giếng (-): đối chứng âm, giếng (+): đối chứng dương, giếng1- 7: vi khuẩn ở mật độ 10^7

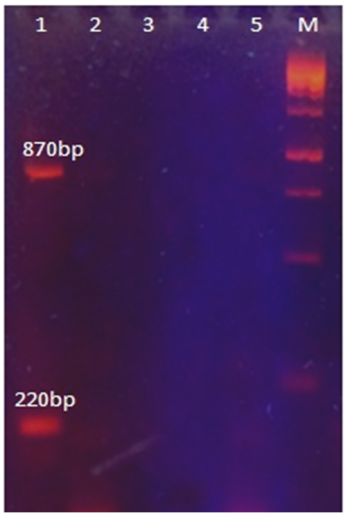
3.7 Kết quả xác định tính đặc hiệu cho phản ứng duplex PCR

Tính đặc hiệu của phản ứng duplex PCR phát hiện *S. agalactiae* và *S. iniae* được kiểm tra với 4 loài vi khuẩn thường được phát hiện trên các đối tượng nuôi thủy sản như *E. ictaluri, A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi*. Kết quả cho thấy sản phẩm điện di chỉ hiện vạch 220 bp và 870 bp (Giếng số 1-Hình 6) đặc hiệu cho *S. agalactiae* và *S. iniae*, tất cả các mẫu còn lại (Giếng 2-5-Hình 6) đều không xuất hiện vạch, chứng tỏ cặp mồi F1/IMOD đặc hiệu cho gen 16S rRNA của *S. agalactiae* và cặp mồi LOX-1/LOX-2 đặc hiệu cho gen *lctO* của *S. iniae.* Kết quả này tương tự với các nghiên cứu khác Jafar *et al.* (2009), Channarong *et al*. (2012), Dương Thành Long (2013) và Ngô Minh Phương (2014) khi khảo sát tính đặc hiệu của cặp mồi F1/ IMOD phát hiện *S. agalactiae* và LOX-1/ LOX-2 phát hiện *S. iniae.*

Các kết quả ghi nhận được cho thấy các cặp mồi F1/IMOD và LOX-1/LOX-2 có tính chuyên biệt cao khi sử dụng phát hiện nhóm vi khuẩn *S. agalactiae và S. iniae.*

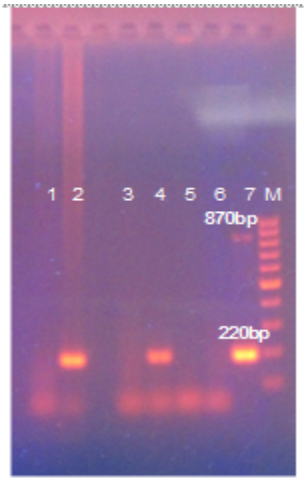
Ngoài ra, quy trình cũng được thử nghiệm với 5 mẫu cá rô đồng với các dấu hiệu bệnh lý của bệnh Streptococcosis bao gồm xuất huyết, gan có đốm trắng, mắt đục, đen thân thu từ ao nuôi ở Cờ Đỏ, thành phố Cần Thơ.

Kết quả qui trình duplex-PCR cho các sản phẩm khuếch đại ở mức 220bp. Kết quả điện di ở Hình 7 cho thấy: giếng 6 (đối chứng âm) không hiện vạch sản phẩm, giếng 7 (đối chứng dương – cho kết quả dương tính với *S. agalactiae* và *S. iniae*, giếng 1 – giếng 5 mẫu cá rô đồng bệnh, trong đó có mẫu cá số 2 và số 4 cho kết quả dương tính với *S. agalactiae* ở mức 220bp. Các kết quả ghi nhận được cho thấy khả năng phát hiện các tác nhân gây bệnh Streptococcosis ở cá.



Hình 6: Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra tính đặc hiệu của quy trình

Giếng 1: Mẫu vi khuẩn S. agalactiae và S. iniae, giếng 2: E. ictaluri, giếng 3: A. hydrophila, giếng 4: V. harveyi, giếng 5: V. parahaemolyticus và giếng M: thang DNA 1kb plus



Hình 7: Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra tính ứng dụng của quy trình

Giếng 1- 5: Mẫu DNA chiết tách từ mẫu cá rô đồng bệnh, giếng 6: mẫu đối chứng âm, giếng 7: mẫu đối chứng dương và giếng M: thang DNA 100bp

4 KẾT LUẬN

Kết quả bước đầu ghi nhận khả năng sử dụng tốt của qui trình duplex-PCR trong việc phát hiện đồng thời *S. agalactiae và S. iniae* từ mẫu DNA chiết tách và mẫu cá bệnh. Qui trình có độ nhạy là: (i) 10^0 cfu/ml tương ứng cho vi khuẩn *S. agalactiae* và (ii) 10^3 cfu/ml tương ứng cho vi khuẩn *S. iniae*. Qui trình duplex PCR được phát triển phù hợp với điều kiện thực tế với các thay đổi về thành phần hoá chất tham gia phản ứng và chu kỳ nhiệt của

phản ứng. Như vậy, qui trình duplex PCR phát hiện *S. agalactiae* và *S. iniae* vừa được tối ưu có thể ứng dụng trong việc phát hiện nhóm tác nhân gây bệnh Streptococcosis trên cá nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Akkarawit I., S. Naraid and T. Chutima, 2012. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae*: a case of *Streptococcus agalactiae* infection in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*). *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 34 (5): 495-500.

Agnew, W. and Barnes, A.C., 2007. *Streptococcus iniae:* An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*. Vol.122: 1-15.

Bartie, K., D.T.H. Oanh, G.Huy, C.Dickson, M. Cnockaert, J.Swing, N.T.Phương and A. Teale, 2006. Ứng dụng REP-PCR và PFGE để định type vi khuẩn kháng chloramphenicol 196 phân lập tại các trại nuôi thủy sản ở Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Công nghệ sinh học, 4(1): 31-40.

Channarong, R., K. Pattanapon, P. Nopadon, W. Janenuj, 2012. Duplex PCR for simultaneous and unambiguous detection of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* associated with *Streptococcosis* of Cultured Tilapia in Thailand. *Thai Veterinary Medicine.* 42(2): 153-158

Dương Thành Long, 2013. Thử nghiệm quy trình PCR phát hiện vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* trên cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.). Luận văn cao học ngành nuôi trồng Thủy sản. Khoa Thủy sản. Đại học Cần Thơ.

Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012a. 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. 22c: 203-212.

Đặng Thị Hoàng Oanh, Trương Quỳnh Như và Nguyễn Đức Hiền, 2012b. 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.

Fadaeifard, F., M. Raissy, H. Momtaz and Zahedi, 2011. Detection of *Streptococcus iniae* by polymerase chain reaction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in west Iran. *African Joumal of Microbiology*. (5): 4722-4724.

Garcia, J.C., P.H Klesius, J.J Evans, C.A. Shoemarker, 2008. Non-infectivity of cattle *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia, *Oreochromis nilotic* and channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*. 281: 151-154

Jafar, Q.A., A. Sameer, A. Salwa, A. Samee, A. Ahmed and A. Faisai, 2009. Molecular investigation of *Streptococcus agalactiae* isolates from environment samples and fish specimens during a massive fish kill in Kuwait Bay. *African Joumal of Microbiology Research*. 3(1): 022-026.

Mata, A.I., M.M. Blanco, L. Dominguez, J.F. Fernandez-Gagayzabal, Alicia Gibello, 2004. Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (*lctO*) gene with potential diagnostic value. *Veterinary Microbiology.* 101: 109- 116.

Ngô Minh Phương, 2014. Rapid detection of *Streptococcus iniae* red tilapia (*Oreochromis* sp.) tissue by PCR. Luận văn tốt nghiệp đại học. Ngành Nuôi trồng thủy sản. Khoa Thủy sản. Đại học Cần Thơ.

Nguyễn Bảo Trung, Trần Hữu Tính, Trần Thị Tuyết Hoa và Từ Thanh Dung, 2013. Phân lập, định danh và xác định tính kháng thuốc của vi khuẩn *Streptococcus iniae* trên cá chẽm (*Lates calcarifer*). Kỷ yếu hội nghị Khoa học trẻ ngành Thủy sản toàn quốc lần thứ IV: 401-405.

Nguyễn Thu Dung và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2013. Đặc điểm bệnh học của bệnh xuất huyết trên cá kèo (*Pseudapocryptes elongates*) nuôi thương phẩm. Kỷ yếu Hội nghị khoa học trẻ ngành Thủy sản toàn quốc lần thứ IV: 209-215.

Phạm Hồng Quân, Hồ Thu Thủy, Nguyễn Hữu Vũ, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Lê Văn Khoa, 2013. 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 Việt Nam. Tạp chí Khoa học và Phát triển. 11(4): 506-513.

Từ Thanh Dung, Huỳnh Thị Ngọc Thanh và Nguyễn Khương Duy, 2013. *Streptococcus iniae*, tác nhân gây bệnh "đen thân" trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 26: 96-103

Trần Thị Xô và Nguyễn Thị Lan, 2005. Cơ sở di truyền và công nghệ gen. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội. 179 trang.

Trần Thị Tuyết Hoa, Dương Thành Long và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2014. Phát triển quy trình PCR phát hiện vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* trực tiếp từ mô cá điêu hồng. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ 35: 121-127

Quyền Đình Thi và Nông Văn Hải, 2008. Những kỹ thuật PCR và ứng dụng trong phân tích DNA. Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Hà Nội. 494 trang.

Romalde, J. L., B. Magarinos, C. Ravelo and A.E.Toranzo, 2009. Vaccination strategies to prevent Streptococcal infections in cultured fish. In: G. Zaccone, C. Perrietre, A. Mathis and B.G. Kapoor (Editior). Fish Defenses Vol (2). Pathogens, Parasites and predators. Science publishers. 403 pp.