



PHÁT HIỆN VI KHUẨN *Streptococcus dysgalactiae* GÂY BỆNH XUẤT HUYẾT TRÊN CÁ BÔNG KÈO (*Pseudapocryptes elongatus*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP PCR

Nguyễn Thu Dung, Lê Thanh Cần và Đặng Thị Hoàng Oanh

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 27/06/2015

Ngày chấp nhận: 26/02/2016

Title:

Detection of *Streptococcus dysgalactiae* causing hemorrhagic disease in mudskipper (*Pseudapocryptes elongatus*) by using polymerase chain reaction

Từ khóa:

Cá bông kèo, bệnh xuất huyết, PCR, *Streptococcus dysgalactiae*

Keywords:

Hemorrhagic disease, mudskipper, PCR, *Streptococcus dysgalactiae*

ABSTRACT

Streptococcus dysgalactiae, the causative agent of haemorrhagic disease, is responsible for most economic loss in the productivity in cultured mudskipper (*Pseudapocryptes elongatus*) in the Mekong Delta, Vietnam. The reasons for ineffective treatment of the disease include slow, inaccurate and cost effective diagnosis procedure. To overcome this matter, a polymerase chain reaction (PCR) procedure using a primer pair STRD-DyI and dys-16S-23S-2 to detect a specific 16S-23S rDNA region of *S. Dysgalactiae* (Hassan et al., 2003) was optimized for detection of *S. dysgalactiae* bacteria in mudskipper. This PCR procedure amplify a specific product of 259 bp by using DNA template extracted from bacteria cultured in brain heart infusion broth. The optimized protocol has detection limit approximately of 50 ng DNA and the specificity was tested with common pathogenic bacteria in fish such as *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Edwardsiella ictaluri* and *Flavobacterium columnare*. The application of this protocol was examined with 9 strains of *S. dysgalactiae* which were isolated from haemorrhagic diseased mudskippers from different farms. The obtained results suggested that optimized protocol can be used for early, accurate and less expensive diagnosis of *S. dysgalactiae* in mudskipper. In addition, the time to diagnose using this PCR procedure is shorter (1/4 time) than conventional bio-chemical method.

TÓM TẮT

Bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Streptococcus dysgalactiae* đã và đang gây nhiều thiệt hại đến năng suất cá bông kèo (*Pseudapocryptes elongatus*) nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long. Nguyên nhân quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị là do chẩn đoán tác nhân gây bệnh chậm, thiếu chính xác và tốn kém. Để khắc phục tình trạng này, quy trình PCR sử dụng hai đoạn mồi STRD-DyI/dys-16S-23S-2 khuếch đại vùng gen 16S-23S rDNA đặc hiệu của vi khuẩn *S. dysgalactiae* (Hassan et al., 2003) được chuẩn hóa để chẩn đoán nhanh *S. dysgalactiae* gây bệnh xuất huyết trên cá bông kèo. Quy trình khuếch đại sản phẩm PCR là 259 bp sử dụng mạch khuôn là DNA ly trích từ vi khuẩn nuôi tăng sinh trong môi trường brain heart infusion broth. Quy trình sau khi tối ưu hóa có độ nhạy là 50 ng DNA và được kiểm tra tính đặc hiệu với một số loài vi khuẩn gây bệnh trong thủy sản như *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Edwardsiella ictaluri* và *Flavobacterium columnare*. Tình ứng dụng của quy trình được kiểm tra với 9 chủng vi khuẩn phân lập từ những mẫu cá bông kèo của bệnh xuất huyết thu ở nhiều trại khác nhau. Kết quả cho thấy quy trình có thể sử dụng để phát hiện tác nhân gây bệnh xuất huyết trên cá bông kèo sớm, chính xác và giảm chi phí. Thời gian chẩn đoán ngắn hơn (khoảng 1/4 lần) so với phương pháp sinh hóa.

Trích dẫn: Nguyễn Thu Dung, Lê Thanh Cần và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016. Phát hiện vi khuẩn *Streptococcus dysgalactiae* gây bệnh xuất huyết trên cá bông kèo (*Pseudapocryptes elongatus*) bằng phương pháp PCR. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 42b: 111-117.

1 GIỚI THIỆU

Cá bống kèo (*Pseudapocryptes elongatus*) đang là đối tượng nuôi thủy sản phổ biến ở vùng ven biển Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Việc nuôi thâm canh cá bống kèo được đẩy mạnh nhằm đáp ứng nhu cầu thị trường nội địa. Tuy nhiên, sự phát triển của nghề nuôi phần lớn do tự phát, không có định hướng hay theo một quy hoạch cụ thể đã dẫn đến tình trạng ô nhiễm môi trường, dịch bệnh đã xảy ra và gây nhiều trở ngại lớn cho nghề nuôi loài cá này. Trong số các bệnh thường gặp ở cá kèo, bệnh xuất huyết là bệnh gây thiệt hại nhiều nhất với tỷ lệ cá chết lên đến 60-70% và thường xuất hiện khi cá nuôi mới thả được 15 ngày đến 2 tháng tuổi. Trong những năm từ 2007-2009, tỷ lệ cá chết khi mắc bệnh có thể lên đến 100% (Nguyễn Thu Dung và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2013).

Vi khuẩn *Streptococcus dysgalactiae* lần đầu tiên được Nguyễn Thu Dung và Đặng Thị Hoàng Oanh (2014) phân lập và định danh trên cá bống kèo bị bệnh xuất huyết. Người nuôi thường sử dụng thuốc kháng sinh để trị bệnh cho cá bống kèo theo kinh nghiệm mà không qua xét nghiệm/chẩn đoán bệnh nên việc điều trị thường không có hiệu quả. Do đó, chẩn đoán sớm tác nhân gây bệnh để có biện pháp phòng trị bệnh hiệu quả là vấn đề rất cần được nghiên cứu và ứng dụng. Phương pháp chẩn đoán bệnh trên cá bống kèo được sử dụng phổ biến nhất hiện nay như cần cứu vào dấu hiệu bệnh lý, quan sát mẫu tươi, phân lập và định danh vi khuẩn bằng phương pháp sinh hóa. Tuy nhiên, các phương pháp trên thường kém chính xác, chi phí cao và mất nhiều thời gian để phân lập, cấy truyền, nuôi và định danh (khoảng 5-7 ngày). Trong khi

phương pháp PCR có thể giúp chẩn đoán nhanh (8-10 giờ), nhạy và chính xác mầm bệnh. Trên thế giới đã có nhiều ứng dụng PCR trong phát hiện/chẩn đoán mầm bệnh vi khuẩn ở cá như phát hiện vi khuẩn *Streptococcus dysgalactiae* phân lập từ những ổ dịch bệnh cá cam ở Nhật (Nomoto *et al.*, 2004); phát hiện *Streptococcus agalactiae* từ mô cá điêu hồng (Jiménez *et al.*, 2011); phát hiện đồng thời *S. iniae* và *S. agalactiae* (Rodkhum *et al.*, 2012) hay xác định được 3 loài vi khuẩn *S. agalactiae*, *S. iniae* và *Lactococcus garvieae* lây nhiễm ở cá rô phi sông Nile và cá điêu hồng (Itsaro *et al.*, 2012). Tuy nhiên, ở Việt Nam nói chung và ĐBSCL nói riêng, do cá bống kèo là đối tượng nuôi mới nên những nghiên cứu về bệnh trên đối tượng này còn nhiều hạn chế, đặc biệt là khả năng phát hiện mầm bệnh bằng phương pháp PCR. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu ứng dụng qui trình PCR để phát hiện vi khuẩn *S. dysgalactiae* gây bệnh xuất huyết ở cá bống kèo nhằm giúp chẩn đoán nhanh và đặc hiệu mầm bệnh, giảm chi phí phân tích, hạn chế rủi ro và tăng hiệu quả cho nghề nuôi cá kèo.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Tổng cộng có 10 chủng vi khuẩn phân lập được từ cá bống kèo bệnh xuất huyết (Bảng 1) được sử dụng. Trong đó, chủng B16T được sử dụng để nghiên cứu chuẩn hóa qui trình PCR. Chín chủng còn lại được sử dụng để kiểm tra khả năng ứng dụng của qui trình. Các chủng vi khuẩn được trữ ở -80°C trong môi trường Brain heart infusion broth có bổ sung 1.5% NaCl (BHIB⁺, Merck) và 25% glycerol.

Bảng 1: Các chủng vi khuẩn phân lập từ cá bống kèo bệnh xuất huyết được chọn nghiên cứu

STT	Mã PTN	Nơi thu mẫu	Cơ quan phân lập	Năm thu mẫu
1	B 1-6T	Thành phố Bạc Liêu	Thận	2014
2	B 1-6TT	Thành phố Bạc Liêu	Tụy tạng	2014
3	B 2-3T	Huyện Hòa Bình, Bạc Liêu	Thận	2014
4	B 2-3TT	Huyện Hòa Bình, Bạc Liêu	Tụy tạng	2014
5	B 2-5G	Huyện Hòa Bình, Bạc Liêu	Gan	2014
6	B 2-6G	Huyện Hòa Bình, Bạc Liêu	Gan	2014
7	B 2-7TT	Huyện Hòa Bình, Bạc Liêu	Tụy tạng	2014
8	B 3-2G	Huyện Đông Hải, Bạc Liêu	Gan	2014
9	B 4-6T	Huyện Đông Hải, Bạc Liêu	Thận	2014
10	B 6-9TT	Huyện Đông Hải, Bạc Liêu	Tụy tạng	2014

Các chủng vi khuẩn được sử dụng để kiểm tra tính đặc hiệu của qui trình PCR là *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio*

parahaemolyticus, *Edwardsiella ictaluri* và *Flavobacterium columnare* từ bộ sưu tập vi khuẩn của Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Phục hồi, nuôi tăng sinh và kiểm tra hình thái, sinh lý và sinh hoá của vi khuẩn

Phục hồi và nuôi tăng sinh vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn (*S. agalactiae*, *A. hydrophila* và *E. ictaluri*) được phục hồi trên môi trường Brain heart infusion agar (BHIA, Merck). Đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* và *S. dysgalactiae* có bổ sung 1.5% NaCl vào môi trường BHIA (BHIA⁺, Merck) và ủ ở 28°C, kiểm tra vi khuẩn thuần sau 36-48 giờ. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh từ 16-18 giờ trong 5 ml môi trường tương ứng là BHIB hoặc BHIB⁺, Merck) ở nhiệt độ 28°C.

Xác định các chỉ tiêu về hình thái, sinh lý và sinh hóa

Các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa được chọn để định danh vi khuẩn được trình bày ở Bảng 2. Hình dạng, kích thước và tính rỗng của vi khuẩn được xác định dưới kính hiển vi; đặc tính Gram của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram. Tính di động của vi khuẩn được quan sát bằng cách nhỏ một giọt nước cất lên lam, trải đều lên lam một ít vi khuẩn, đập bằng lamên và quan sát bằng kính hiển vi ở vật kính 40X. Các đặc điểm sinh lý và sinh hóa được xác định dựa theo cẩm nang của Cowan và Steels (Barrow và Feltham, 1993) và sử dụng kit API 20 Strep (BioMerieux, Pháp).

2.3 Giải trình tự đoạn gen 16S rDNA

Trích DNA: DNA từ vi khuẩn được trích theo phương pháp của Bartie và *ctv.* (2006). Vi khuẩn được nuôi tăng sinh từ 16-18 giờ trong 5 ml môi trường BHIB⁺ ở nhiệt độ 28 °C, sau đó được sử dụng để ly trích DNA bằng cách cho 1.5 ml dung dịch vi khuẩn vào ống ly tâm cùng với 100 µl 10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0 (TE). Hỗn hợp được đun nóng ở 95 °C trong 15 phút, rồi được làm lạnh trong nước đá và ly tâm 2 phút ở vận tốc 14.000 vòng/phút để tách dung dịch DNA và trữ ở -20 °C cho đến khi sử dụng.

Hàm lượng DNA được đo bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 260 nm theo công thức: Hàm lượng DNA (µg/ml) = Giá trị đo ở 260 nm x 50 x độ pha loãng.

Khuếch đại DNA: Thành phần hóa chất phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen 16S rDNA: được thực hiện dựa theo qui trình của Nunan *et al.* (2003). Tổng thể tích phản ứng 50 µl gồm 1X dung dịch đệm; 2 mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 2.5 UI Taq DNA polymerase; 0.22 µM mỗi xuôi (7611F); 0.22 µM mỗi ngược (7611R) và 20 ng mẫu DNA.

Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 95 °C trong 2 phút; sau đó 95 °C trong 30 giây, 45 °C trong 30 giây, 72 °C trong 2 phút; lặp lại chu kỳ trên 30 lần; 45 °C trong 1 phút; 72°C trong 2 phút. Trọng lượng phân tử đoạn DNA của *S. dysgalactiae* cần phát hiện là 1500 bp.

Giải trình tự: Sản phẩm PCR gen 16S rRNA được gửi đến Công ty Nam Khoa giải trình tự. Kết quả giải trình tự được so sánh bằng công cụ BLASTsearch trên ngân hàng gen (GenBank) của NCBI để định danh loài vi khuẩn.

2.4 Phương pháp PCR phát hiện *Streptococcus dysgalactiae*

Thành phần hóa chất phản ứng PCR phát hiện *S. dysgalactiae*: được thực hiện dựa theo qui trình của Hassan *et al.* (2003). Tổng thể tích phản ứng 30 µl, gồm: 1 X dung dịch đệm; 1.5 mM MgCl₂; 0.2 mM dNTPs; 1U Taq DNA polymerase; 0.33 µM mỗi xuôi (STRD-DyI); 0.33 µM mỗi ngược (dys-16S-23S-2) và 50ng mẫu DNA vi khuẩn. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 94 °C trong 4 phút; sau đó 94 °C trong 30 giây, 50 °C trong 60 giây, 72 °C trong 30 giây; lặp lại chu kỳ trên 30 lần; 72 °C trong 5 phút; giữ ở 20 °C. Trọng lượng phân tử đoạn DNA của *S. dysgalactiae* cần phát hiện là 259 bp.

Qui trình PCR phát hiện *S. dysgalactiae* phân lập từ cá bông kèo được tối ưu gồm có: (i) tăng nồng độ mỗi xuôi và mỗi ngược; (ii) tăng nồng độ Taq và (iii) tăng chu kỳ khuếch đại.

Xác định độ nhạy của phản ứng PCR phát hiện *S. dysgalactiae*: độ nhạy của phản ứng PCR phát hiện *S. dysgalactiae* được thực hiện bằng cách pha loãng 2 lần dung dịch DNA chiết tách từ vi khuẩn chưa pha loãng bằng dung dịch đệm TE theo tỷ lệ 1:1. thành nhiều nồng độ từ cao xuống thấp.

DNA vi khuẩn giảm dần từ nồng độ chiết tách chưa pha loãng (3200 ng) đến nồng độ sau 8 lần pha loãng (25 ng).

Xác định tính chuyên biệt của qui trình PCR phát hiện *S. dysgalactiae*: Tính chuyên biệt của qui trình PCR phát hiện vi khuẩn *S. dysgalactiae* được thực hiện với các loài vi khuẩn thường hiện diện trong các loài thủy sản nuôi là: *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Edwardsiella ictaluri*, *Flavobacterium columnare* và *Aeromonas hydrophila*.

Khả năng ứng dụng của qui trình PCR phát hiện *S. dysgalactiae*: Kiểm tra khả năng ứng dụng của qui trình với một số chủng vi khuẩn *S.*

dysgalactiae có nguồn gốc khác nhau từ bộ sưu tập vi khuẩn của Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

2.5 Điện di

10 µl sản phẩm PCR được điện di trên gel 1.5% agarose (ABgene, UK) trong dung dịch đệm 1 X TAE (10 mM Tris, 5 mM acetate, 0.1 mM EDTA). Kết quả điện di được ghi nhận bằng máy đọc gel Vilber Lourmat (Pháp). Thang DNA 1 kb plus (Invitrogen) được điện di chung với mẫu để xác định kích thước.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá của các chủng *S. dysgalactiae*

Trên môi trường BHIA⁺ sau 48 giờ ở 28°C vi khuẩn phát triển chậm thành các khuẩn lạc có hình tròn, lồi, màu trắng đục, kích thước khoảng 0,7-1 mm. Vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường có chứa 5% máu cừu nhưng không có khả năng gây tan huyết. Chúng là vi khuẩn Gram dương, hình cầu hay liên cầu, 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. Dựa trên kết quả xác định các chỉ tiêu sinh hóa bằng kit API 20 Strep, tất cả 10 chủng vi khuẩn được định danh là *Streptococcus dysgalactiae*.

3.2 Kết quả giải trình tự

Bốn chủng vi khuẩn (B1-6T, B2-3TT, B2-5G và B6-9TT) được chọn để khuếch đại gen 16S rDNA và giải trình tự. Kết quả so sánh trình tự nucleotide đoạn gen 16S rDNA trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gen (GenBank) bằng công cụ BLASTn, các chủng B1-6T (tương đồng 99%), B2-3TT (tương đồng 99%), B2-5G (tương đồng 100%) và B6-9TT (tương đồng 99%) với đoạn gen 16S rDNA của chủng vi khuẩn *Streptococcus dysgalactiae subsp* được phân lập từ cá nục bệnh (số hiệu Genbank là KM077497.1).

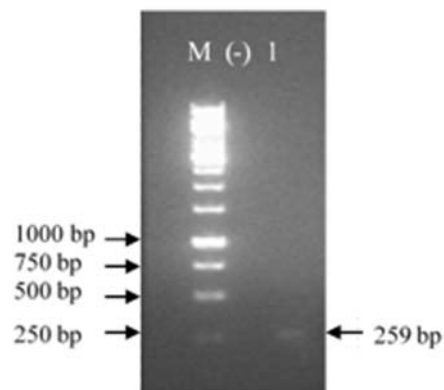
3.3 Kết quả PCR

3.3.1 Quy trình PCR phát hiện vi khuẩn *S. dysgalactiae* theo Hassan et al. (2003)

Dựa vào kết quả giải trình tự, cặp mồi STRD-DyI/dys-16S-23S-2 khuếch đại vùng gen 16S-23S rDNA đặc trưng của *S. dysgalactiae* được chọn để thực hiện quy trình PCR sử dụng DNA chiết tách từ chủng vi khuẩn B16T (Mục 2.3) để làm mạch khuôn. Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 1)

hiện vạch DNA đặc hiệu của vi khuẩn *S. dysgalactiae* ở vị trí 259 bp.

Ở động vật thủy sản, cặp mồi đặc hiệu STRD-DyI/dys-16S-23S-2 được nhiều tác giả sử dụng để phát hiện vi khuẩn *S. dysgalactiae* gây bệnh. Nomoto et al. (2004) sử dụng phương pháp PCR phát hiện 5 chủng *S. dysgalactiae* phân lập từ cá cam Nhật bị bệnh. Sau đó, Netto et al. (2011) phát hiện đầu tiên vi khuẩn *S. dysgalactiae* gây bệnh trên cá rô phi sông Nile (*Oreochromis niloticus*) cũng bằng cặp mồi trên. Mặc dù, kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *S. dysgalactiae* phân lập từ cá bống kèo theo quy trình của Hassan et al. (2003) hiện vạch 259 bp, nhưng vạch DNA chưa sáng rõ nên cần tối ưu hóa các thành phần hóa chất và điều kiện phản ứng PCR để có kết quả khuếch đại tốt hơn.



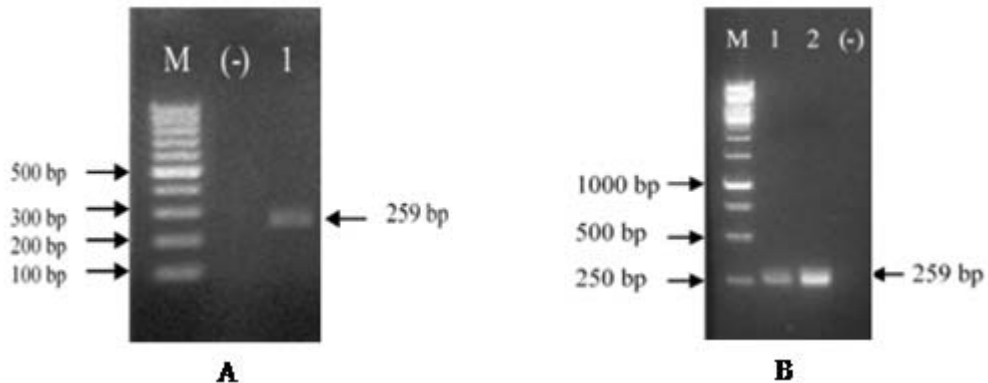
Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *S. dysgalactiae*. Giếng M: thang DNA 1 kb plus; giếng (-): mẫu đối chứng âm (nước); giếng 1: Chủng B16T

3.3.2 Tối ưu thành phần hóa chất và điều kiện phản ứng PCR phát hiện vi khuẩn *S. dysgalactiae*

Một phản ứng PCR tuy khuếch đại được sản phẩm đặc hiệu nhưng vạch DNA chưa sáng rõ có thể do số lượng bản sao được tạo ra ít. Một trong số các nguyên nhân làm cho quá trình khuếch đại chưa tối ưu có thể là nồng độ môi, *Tag* DNA polymerase hoặc MgCl₂ chưa đủ; hay số lượng chu kỳ khuếch đại chưa phù hợp; chất lượng của các mạch khuôn DNA chưa tốt (Quyền Đình Thi và ctv., 2008). Quy trình PCR phát hiện *S. dysgalactiae* phân lập từ cá bống kèo được tối ưu gồm có: (i) tăng nồng độ môi xuôi và môi ngược từ 0,33 µM lên 0,4 µM; (ii) tăng nồng độ Taq từ 1U lên 1,25 U/phản ứng) và (iii) tăng chu kỳ khuếch đại từ 30-35 chu kỳ. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *S. dysgalactiae* phân lập từ cá bống kèo sau khi tối ưu được thể hiện ở Hình 2. Như vậy,

sau khi điều chỉnh qui trình bằng cách tăng nồng độ môi, tăng nồng độ Taq thì sản phẩm PCR hiện vạch rõ và không có sản phẩm không đặc hiệu. Tuy

nhiên, khi tăng chu kỳ phản ứng thì sản phẩm khuếch đại không sai khác nhiều so với qui trình ban đầu.

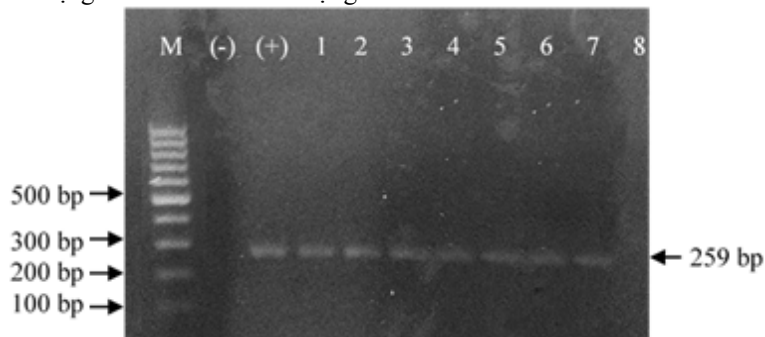


Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *S. dysgalactiae*. (A). Sau khi tăng nồng độ môi. Giếng (-): đối chứng âm (nước); Giếng 1: mẫu dương tính với nồng độ môi 0,40,4 μ M. (B). Sau khi thay đổi nồng độ enzyme. Giếng M: thang DNA 1kb plus; Giếng (-): đối chứng âm (nước); Giếng 1-2: mẫu dương tính với nồng độ enzyme từ trái qua phải là 0,75 U và 1,25 U

3.3.3 Độ nhạy của qui trình

Kết quả điện di sản phẩm PCR với nồng độ DNA vi khuẩn giảm dần từ nồng độ chiết tách chưa pha loãng (3200 ng) đến nồng độ sau 8 lần pha loãng (25 ng) cho thấy sản phẩm hiện các vạch sáng và mờ dần theo sự giảm dần của hàm lượng

DNA nhưng vẫn quan sát được tốt ở hầu hết các vạch. Tuy nhiên, ở nồng độ 25 ng thì không hiện vạch (Hình 3). Do đó, qui trình có thể phát hiện được vi khuẩn *S. dysgalactiae* ở hàm lượng DNA thấp nhất là 50 ng.



Hình 3: Độ nhạy của qui trình PCR phát hiện *S. dysgalactiae*. Giếng M: thang DNA 100 bp; Giếng (-): đối chứng âm (nước); Giếng (+): mẫu dương tính; Giếng 1-8: mẫu *S. dysgalactiae* (B16T) với các hàm lượng DNA giảm dần từ 3200 ng - 25 ng

3.3.4 Tính đặc hiệu của qui trình

Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 4) cho thấy qui trình khuếch đại chỉ hiện vạch 259 bp của vi khuẩn *S. dysgalactiae* mà không hiện vạch đối với các chủng vi khuẩn thường gây bệnh cho động vật thủy hải sản được kiểm tra (*S. agalactiae*, *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus*, *E. ictaluri* và *F. columnare*). Như vậy, qui trình PCR sử dụng cặp môi STRD-DyI/dys-16S-23S-2 có tính đặc hiệu khi phát hiện vi khuẩn *S. dysgalactiae*. Hassan *et al.* (2003) lần đầu tiên sử dụng cặp môi STRD-

DyI/dys-16S-23S-2 đã xác định tính đặc hiệu của qui trình PCR giúp phân biệt *S. dysgalactiae* với nhiều chủng vi khuẩn như *S. canis*, *S. agalactiae* và đặc biệt với loài *Lactococcus garvieae*, khắc phục được sự chẩn đoán nhầm các tác nhân khác nhau nhưng gây ra dấu hiệu bệnh lý giống nhau của các loài vi khuẩn này. Qua đó có thể thấy rằng, nghiên cứu xác định tính đặc hiệu là một trong các yếu tố quan trọng để hoàn thiện một qui trình PCR chẩn đoán tác nhân gây bệnh.



Hình 4: Kết quả xác định tính đặc hiệu. Giếng M: thang DNA 1 kb pkus; Giếng 1: *S. dysgalactiae* dương tính; Giếng 2-6: *S. agalactiae*, *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus*, *E. ictaluri*, *F. columnare* với cặp môi đặc hiệu cho *S. dysgalactiae*; Giếng 7-11: các mẫu vi khuẩn chuẩn *S. agalactiae*, *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus*, *E. ictaluri*, *F. columnare*

3.3.5 Khả năng ứng dụng của qui trình

Khả năng ứng dụng của qui trình PCR được thực hiện nhằm kiểm tra khả năng phát hiện nhiều chủng vi khuẩn *S. dysgalactiae* khác ngoài chủng

B16T đã được chuẩn hóa. Kết quả là 9 chủng vi khuẩn phân lập từ cá bông kèo bệnh xuất huyết (Bảng 1) đều hiện vạch 259 bp (Hình 5).



Hình 5: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* từ mẫu cá kèo bệnh được thu từ nhiều trại nuôi. Giếng M: thang DNA 1 kb plus; Giếng (+): đối chứng dương (B16T); Giếng 1-10: các chủng vi khuẩn (2-10) ở bảng 1; Giếng (11): đối chứng âm (nước)

Kết quả ở Hình 5 cho thấy qui trình PCR với cặp môi đặc hiệu đã có ứng dụng tốt để phát hiện vi khuẩn *S. dysgalactiae* trên cá bông kèo bị bệnh xuất huyết. Kết quả trên cũng phù hợp với kết quả của Hassan *et al.* (2003) sử dụng cặp môi STRD-DyI/dys-16S-23S-2 phát hiện 61 chủng *S. dysgalactiae* thuộc 3 nhóm huyết thanh C, G và L. Nomoto *et al.* (2004) cũng sử dụng cặp môi và qui trình phân ứng trong nghiên cứu của Hassan *et al.* (2003) để phát hiện 5 chủng *S. dysgalactiae* phân lập từ cá bệnh và 2 chủng chuẩn *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* ATCC43078, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ATCC35666.

4 KẾT LUẬN

Qui trình PCR sử dụng cặp môi STRD-DyI/dys-16S-23S-2 có thể chẩn đoán nhanh và đặc hiệu vi khuẩn *Streptococcus dysgalactiae* gây bệnh

xuất huyết trên cá bông kèo với kích thước sản phẩm PCR là 259 bp. Thành phần phản ứng PCR được chuẩn hóa trong 30 μ L bao gồm: 1 X PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,4 μ M môi STRD-DyI/dys-16S-23S-2, 1,25 U *Taq* DNA polymerase và 2,5 μ L DNA. Độ nhạy của qui trình là 50 ng DNA vi khuẩn; tính đặc hiệu giúp phân biệt mẫu nhiễm vi khuẩn *S. dysgalactiae* với các loài vi khuẩn phổ biến khác trong thủy sản như: *S. agalactiae*, *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus*, *E. ictaluri* và *F. columnare*. Qui trình có khả năng phát hiện nhiều chủng vi khuẩn *S. dysgalactiae* phân lập từ cá bông kèo bệnh xuất huyết.

LỜI CẢM ƠN

Các nội dung trong bài báo này được thực trong khuôn khổ đề tài cấp bộ "Nghiên cứu bệnh xuất huyết trên cá Bông kèo (*Pseudapocryptes*

lanceolatus) nuôi thương phẩm và đề xuất giải pháp phòng, trị” (Mã số: B2013- 16-29) do Bộ Giáo dục và Đào tạo cấp kinh phí.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barrow, G. I. and R. K. A. Feltham. 1993. Cowan and Steel’s manual for the identification of medical bacteria, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge. 262.
- Bartie, K., Đ. T. H. Oanh, G. Huy, C. Dickson, M. Cnockaert, J. Swings, N. T. Phương, A. Teale. 2006. Tạp chí Công nghệ sinh học 4 (1): p31-40
- Buller, N.B. 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practice identification manual, 361 pp.
- Hassan, A.A., I.U. Khan and C. Lämmner. 2003. Identification of *Streptococcus dysgalactiae* Strains of Lancefield’s group C, G and L by Polymerase Chain Reaction. Journal of Veterinary Medicine. B, 50: 161–165.
- Imperi, M., M. Pataracchia, G. Alfarone, L. Baldassarri, G. Orefici and R. Creti. 2010. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. Journal of Microbiological Methods, 80: 212–214.
- Itsaro, A., N. Suanyuk and C. Tantikitti. 2012. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae*: a case of *S. 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.
- Jiménez, A., V. Tibatá, H. Junca, F. Ariza, N. Verjan and C. Iregui. 2011. Evaluating a nested-PCR assay for detecting *Streptococcus agalactiae* in red tilapia (*Oreochromis sp.*) tissue. Aquaculture, 321: 203-206.
- Netto, L.N., C.A.G. Leal, H.C.P. Figueiredo. 2011. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Journal of Fish Diseases, 34: 251-254.
- Nguyễn Thu Dung và Đặng Thị Hoàng Oanh. 2013. Hiện trạng về quản lý dịch bệnh trong nuôi cá bông kèo (*Pseudapocryptes lanceolatus*) ở tỉnh Bạc Liêu. Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học, số 27: 169-177.
- Nguyen Thu Dung and Dang Thi Hoang Oanh. 2014. Isolation and characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from mudskipper (*Pseudapocryptes elongatus*) cultured in the mekong delta of Vietnam. Book of abstracts. The 9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 24 - 28 November 2014. Ho Chi Minh City, Vietnam. 187.
- Nomoto, R., L., D. Munasinghe, Y. Jin, H. Shimahara, H. Yasuda and A. Nakamura. 2004. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. Journal of Fish Diseases, 27: 679-686.
- Nunan L.M., B.T. Poulos, R. Redman, M. Le Groumellec and D.V. Lightner. 2003. Molecular detection methods developed for a systemic rickettsia-like bacterium (RLB) in *Penaeus monodon* (Decapoda: Crustacea). Diseases of Aquatic Organisms, 53:15–23.
- Quyền Đình Thi, Nông Văn Hải, 2008. Những kỹ thuật PCR và ứng dụng trong phân tích DNA Tập II. Nhà xuất bản Tự nhiên và Công nghệ. 1-494.
- Rodkhum, C., P. Kayansamruaj, N. Pirarat and J. Wongtawatchai. 2012. Duplex PCR for Simultaneous and Unambiguous Detection of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* associated with Streptococcosis of Cultured Tilapia in Thailand. Thai Journal of Veterinary Medicine, 42(2): 153-158.