

PHÁT TRIỂN QUI TRÌNH PCR PHÁT HIỆN *Streptococcus agalactiae* TRỰC TIẾP TỪ MÔ CÁ ĐIỀU HỒNG

Trần Thị Tuyết Hoa¹, Dương Thành Long¹ và Đặng Thị Hoàng Oanh¹

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 28/05/2014

Ngày chấp nhận: 30/12/2014

Title:

Development of a PCR procedure for the detection of *Streptococcus agalactiae* directed in red tilapia tissue

Từ khóa:

PCR, *S. agalactiae*, mô cá, F1/IMOD

Keywords:

PCR, *S. agalactiae*, fish tissue, F1/IMOD

ABSTRACT

This study was conducted to develop the PCR protocol which detects *S. agalactiae* from infected fish. The research included: (i) optimization of DNA extraction procedure from fish tissues. The DNA extraction procedure from fish tissues was performed following the methods employed by Taggart et al. (1992), Buller (2004), and Monfared et al. (2011). It was found that the first two methods were better at DNA concentration and the purity of extracted DNA. Besides, DNA that was extracted from brain was better than from kidney; (ii) PCR protocol for the detection of *S. agalactiae* amplified a specific product of 220 bp. The specific of optimized PCR was tested with some common bacterial isolates in aquaculture such as *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus iniae* and *Vibrio harveyi*. The application of this protocol was also examined and positive results were obtained, indicating that the protocol could detect different isolates of *S. agalactiae* and from red tilapia samples with haemorrhage and exophthalmia in clinical signs.

TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện nhằm phát triển qui trình PCR phát hiện vi khuẩn *S. agalactiae* trực tiếp trên mô cá. Nghiên cứu bao gồm: (i) tối ưu hóa qui trình chiết tách DNA từ mô cá. DNA được chiết tách từ mô cá theo phương pháp của Taggart et al. (1992) và Buller (2004) cho kết quả tốt hơn phương pháp của Monfared et al. (2011) về hàm lượng và độ tinh sạch của DNA chiết tách. Bên cạnh đó, DNA được chiết tách từ não cho kết quả tốt hơn ở thận; (ii) Qui trình PCR cho kết quả với vạch sản phẩm đặc hiệu của vi khuẩn *S. agalactiae* là 220 bp. Tính đặc hiệu của qui trình PCR được kiểm tra với một số chủng vi khuẩn phổ biến trong thủy sản gồm *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus iniae* và *Vibrio harveyi*. Tính ứng dụng của qui trình cũng được kiểm tra và cho kết quả tốt. Qui trình có thể phát hiện các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* khác nhau và từ các mẫu cá điều hồng có dấu hiệu bệnh xuất huyết, lồi mắt.

1 GIỚI THIỆU

Cá điều hồng một loài cá lai từ cá rô phi có tốc độ tăng trưởng nhanh, giá trị dinh dưỡng cao tuy nhiên do khả năng kháng bệnh thấp, đồng thời với mật độ nuôi cao nên dẫn đến cá dễ mắc bệnh. Trên

cá điều hồng, bệnh lồi mắt, xuất huyết được xác định là do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*. Bệnh này đã được ghi nhận gây chết cá ở một số bè nuôi ở An Giang, Tiền Giang và Vĩnh Long. Bệnh thường xuất hiện vào mùa mưa và các tháng giao

mùa với tỉ lệ chết cao, gây thiệt hại nghiêm trọng (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012).

Vi khuẩn *S. agalactiae* được ghi nhận là tác nhân gây bệnh nghiêm trọng trên cá nước ngọt và nước mặn, như cá hồi chấm đen, cá rô phi, cá da trơn, cá mú, cá chim trắng (Amal and Zamri-saad., 2011). Brian (2009) đã tiến hành nghiên cứu bệnh do vi khuẩn *Streptococcus* gây ra ở Châu Á và Châu Mỹ Latinh. Kết quả nghiên cứu cho thấy các loài vi khuẩn chủ yếu là *S. iniae* và *S. agalactiae* thuộc tuýp 1, tuýp 2. Trong đó, *S. agalactiae* tuýp 2 là vi khuẩn gây bệnh chủ yếu trên cá rô phi ở các nước Châu Á (Trung Quốc, Việt Nam, Indonesia, Philippines, Thái Lan) và các nước Mỹ La tinh (Ecuador, Honduras, Mexico và Brazil).

Hiện nay, phương pháp phổ biến dùng để phát hiện vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá bao gồm phương pháp sinh hóa truyền thống hoặc sử dụng bộ kit API 20Strep (BioMerieux) và PCR. Tuy nhiên, các phương pháp sinh hóa cần nhiều thời gian cho phân lập, nuôi cấy và định danh vi khuẩn. Thời gian sử dụng cho các phương pháp này thường kéo dài khoảng 4-5 ngày do vậy không đáp ứng được cho yêu cầu chẩn đoán bệnh hiện nay. Gần đây đã có một số qui trình PCR phát hiện vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá. Maisak *et al.* (2008) đã dùng phương pháp PCR để phát hiện và phân biệt vi khuẩn *Streptococcus spp.*, *S. iniae* và *S. agalactiae* trên cá rô phi bệnh *Streptococcosis*. Bên cạnh đó, Channarong *et al.* (2012) đã thực hiện qui trình duplex PCR để phát hiện *S. iniae* và *S. agalactiae* trên cá rô phi với độ nhạy là 10^6 cfu/g mô cá. Các qui trình PCR này giúp phát hiện sớm, chính xác vi khuẩn gây bệnh, thời gian thực hiện ngắn hơn các phương pháp sinh hóa truyền thống.

Do vậy, nghiên cứu phát triển qui trình PCR phát hiện *S. agalactiae* trực tiếp trên mô cá điều hồng là cần thiết nhằm: rút ngắn thời gian phân tích và vẫn giữ khả năng phát hiện bệnh với độ chính xác cao.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu vật dùng cho nghiên cứu bao gồm các nguồn: (i) Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* (SaS, S1, S2, S4, S5), *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus iniae* và *Vibrio harveyi* từ bộ sưu tập vi khuẩn của Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ; (ii) Cá điều hồng có trọng lượng trung bình 500 g/con mua từ chợ ở Thành phố Cần

Thơ sử dụng cho nội dung tối ưu qui trình ly trích DNA; (iii) Cá điều hồng (trọng lượng 15-30 g/con) có dấu hiệu bệnh (xuất huyết, lồi mắt) thu từ Đồng Tháp sử dụng cho nội dung kiểm tra khả năng ứng dụng qui trình.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Phục hồi và nuôi tăng sinh vi khuẩn: Vi khuẩn *S. agalactiae* được phục hồi trên môi trường Brain Heart Infusion Agar (BHIA) ở nhiệt độ 37°C. Sau 36-48 giờ quan sát hình dạng, màu sắc khuẩn lạc và nhuộm gram để kiểm tra tính thuần của vi khuẩn. Sau đó vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường Brain Heart Infusion Broth (BHIB) trong vòng 48 giờ.

Vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. hydrophila*, *S. iniae* và *V. harveyi* được phục hồi trên môi trường Trypticase soy agar (TSA) hoặc TSA bổ sung 1,5% NaCl và ủ ở nhiệt độ 28-30°C.

Ly trích DNA của vi khuẩn: Vi khuẩn được nuôi tăng sinh (24-48 giờ) môi trường BHIB ở nhiệt độ 32°C. Lấy 1,5 ml dung dịch vi khuẩn sau khi nuôi tăng sinh được chuyển sang ống eppendorf mới và cho vào 100 µl dung dịch TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0). Hỗn hợp đun nóng ở 95°C trong 15 phút rồi làm lạnh nhanh trong nước đá. Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 2 phút để tách DNA và trữ ở -20°C cho đến khi sử dụng (Bartie *et al.*, 2006).

Phương pháp ly trích DNA từ mô thận và não cá - phương pháp I: (Taggart *et al.*, 1992): Qui trình được thực hiện bao gồm các bước: Thận/Não cá được nghiền nhuyễn trong 600 µl dung dịch Lysis buffer (0,5 M NaCl, 0,001 M EDTA, 1% SDS, 0,8% Triton, 0,1 M Tris-HCl), 40 µl SDS 10% và 2,5 µl Proteinase K (40 mg/ml), đảo ống và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 15 phút. Cho vào 2,5 µl Rnase (2 mg/ml), đảo ống và tiếp tục ủ dung dịch ở nhiệt độ 37 °C trong 30 phút. Cho vào 600 µl Chloroform – Isoamyl (24:1), đảo và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút. Rút dịch nổi cho vào ống eppendorf 1,5 ml mới và thêm 600 µl Phenol – Chloroform – Isoamyl (25:24:1), đảo ngược ống và ly tâm 13.000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C. Lặp lại bước trên 1 lần nữa rồi cho vào 600 µl Isopropanol lạnh, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. DNA lắng ở đáy ống, nhẹ nhàng loại bỏ dung dịch phía trên. Cho vào 600 µl cồn 70% lạnh, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Nhẹ nhàng loại bỏ cồn phía trên. Lặp lại bước trên 1 lần nữa và loại bỏ cồn thật kỹ. Phơi khô mẫu trong vòng vài giờ ở nhiệt độ phòng. Cho 50 µl TE

buffer (10 mM Tris, 1mM EDTA, có pH 7) vào ống eppendorf bảo quản ở -20°C.

Phương pháp ly trích DNA từ mô thận và não cá - phương pháp II: (Monfared *et al.*, 2011): Nghiền nhuyễn mẫu thận/não (150 mg) trong 150 µl PBS. Ly tâm 3.000 vòng/phút trong 5 phút và lấy dịch nổi chuyển sang ống eppendorf mới. Tiếp tục ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút. Thêm vào một lượng PBS bằng với lượng mẫu trong ống eppendorf. Sau đó thêm vào 20 µl Lysozyme (10 mg/ml) và ủ ở 37°C trong 15 phút. Mẫu được ủ trong vòng 4 giờ ở 56°C với Lysis Buffer (50 mM Tris-HCL, 1% SDS, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 20 mg/ml proteinase K, pH 8). Cho Phenol vào, trộn mẫu 20 giây, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút. Cần thận rút dịch nổi phía trên cho vào ống eppendorf mới. Cho vào mẫu lượng Phenol: Chloroform (1:1) bằng với lượng mẫu hiện có, vortex ống tube 20 giây, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút. Cần thận rút dịch nổi phía trên cho vào ống eppendorf mới. Cho vào mẫu lượng Chloroform bằng với lượng mẫu hiện có, vortex ống tube 20 giây, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút. Cần thận rút dịch nổi phía trên cho vào ống eppendorf mới. Mẫu được làm sạch trong ethanol lạnh (96°C) với thể tích bằng với lượng mẫu hiện có và ủ ở -20°C trong 20 phút. Sau đó tiếp tục ly tâm 1.300 vòng/phút trong 15 phút. Thêm vào 200 µl cồn 70%, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút và nhẹ nhàng rút bỏ phần dịch nổi phía trên ra khỏi ống eppendorf. Mẫu được phơi khô ở nhiệt độ phòng, sau đó thêm vào 50 µl nước cất và trữ mẫu ở 4°C cho đến khi phân tích.

Phương pháp ly trích DNA từ mô thận và não cá - phương pháp III: (Buller, 2004 có điều chỉnh): Qui trình được thực hiện bao gồm các bước: nghiền nhuyễn mẫu thận/não trong 100 µl PBS, thêm 10 µl lysozyme (10mg/ml) và ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, mẫu được thêm vào 10 µl Chelex -100 resin, ủ mẫu ở 56°C trong 10 phút. Thêm vào 200 µl Trixton X-100. Ủ 100°C trong 10 phút. Làm lạnh mẫu trong nước đá rồi ly tâm 12.000 vòng/phút trong 3 phút. Rút dịch nổi trữ ở 4°C.

Phương pháp đo nồng độ và độ tinh sạch của DNA: Nồng độ DNA của mẫu được xác định bằng máy so màu quang phổ sử dụng bước sóng 260 nm

và 280 nm. Độ tinh sạch được đánh giá bằng tỷ lệ giữa độ hấp thụ ánh sáng ở hai bước sóng 260 nm và 280 nm.

Phương pháp PCR phát hiện vi khuẩn *S. agalactiae* (Channarong *et al.*, 2012) Qui trình PCR phát hiện *S. agalactiae* sử dụng đoạn mồi F1:5'-AGTTTGATCATGGGTCAG-3' và IMOD: 5'-ACCAACATGTGTTAATTACTC-3'. Thành phần hóa chất tham gia phản ứng: 1X Taq buffer với MgCl₂; 0,5 mM dNTPs; 0,75U Taq DNA polymerase; 0,4 µM mồi F1; 0,4 µM mồi IMOD; 1 µl DNA ly trích. Điều kiện phản ứng: 95°C trong 5 phút, tiếp theo 95°C trong 1 phút, 52°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút chu kỳ này được lặp lại 30 lần, cuối cùng 72°C trong 7 phút. Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu hiện vạch ở vị trí 220bp.

Xác định độ nhạy của phản ứng PCR phát hiện *S. agalactiae*: Độ nhạy của phản ứng PCR phát hiện *S. agalactiae* được thực hiện ở các nồng độ vi khuẩn từ 10⁷ xuống 10² cfu/0,5g mô thận cá điều hồng.

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

Khả năng ứng dụng của qui trình PCR phát hiện vi khuẩn *S. agalactiae*: Kiểm tra khả năng ứng dụng của qui trình ở bốn mẫu vi khuẩn *S. agalactiae* thu ở các địa điểm khác nhau. Đồng thời ứng dụng qui trình trên bốn mẫu cá (cá bệnh có dấu hiệu bệnh lý như lồi mắt, xuất huyết trên thân, mang,...) để xác định khả năng ứng dụng của qui trình.

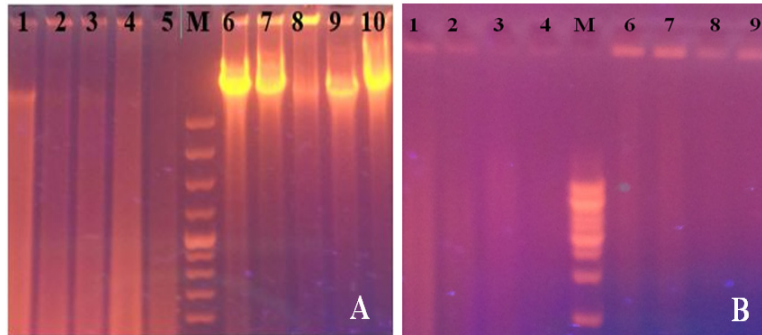
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ly trích DNA từ mô thận và não cá điều hồng

Tổng số 26 mẫu cá điều hồng có trọng lượng trung bình khoảng 500 g được phân tích để xác định khả năng ứng dụng của các qui trình tách chiết DNA trực tiếp từ mô cá. Thận và não cá sau khi ly trích bằng phương pháp I, II, III được xác định hàm lượng và độ tinh sạch của DNA chiết tách.

Bảng 1: Hàm lượng và độ tinh sạch của DNA chiết tách với 3 phương pháp

Phương pháp	Hàm lượng DNA (ng/ μ l)		Độ tinh sạch	
	Mô thận	Mô não	Mô thận	Mô não
I	2.428 \pm 1.189	1.510 \pm 73,6	1,35 \pm 0,20	1,20 \pm 0,14
II	1.398 \pm 664,5	1.128 \pm 647,4	1,19 \pm 0,09	1,12 \pm 0,02
III	2.171 \pm 720,4	1.616 \pm 643,0	1,29 \pm 0,11	1,21 \pm 0,06



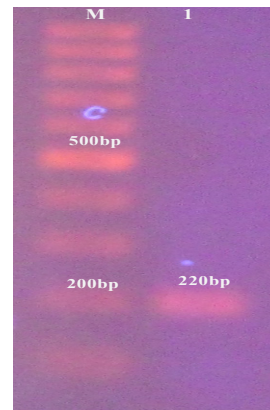
Hình 1: Kết quả điện di DNA chiết tách với gel 2% agarose, (A) theo phương pháp I, Giếng 1-5: DNA chiết tách từ thận, Giếng 6-10: DNA chiết tách từ não, Giếng M: thang DNA 100 bp (B) phương pháp III, Giếng 1-4: DNA từ chiết tách thận, Giếng 5-8: DNA từ chiết tách não, Giếng M: thang DNA 1kb

Qua kết quả từ Bảng 1 cho thấy hàm lượng DNA và độ tinh sạch của phương pháp I, III tốt hơn so với phương pháp II. Ngoài ra, với kết quả điện di gel 2% cho thấy: (i) Phương pháp chiết tách I cho kết quả chiết tách với tổng số 46/52 mẫu đạt và phương pháp III cho 48/52 mẫu đạt, hai phương pháp cho kết quả tương đương nhau. (ii) Trong khi đó, phương pháp II không cho kết quả chiết tách được DNA chỉ với 2 mẫu đạt trong tổng số 52 mẫu chiết tách. Do vậy, phương pháp ly trích DNA I và III được chọn để so sánh khả năng ly trích DNA từ hai cơ quan thận và não cá điều hồng.

Qua kết quả điện di Hình 1 cho thấy, cả hai phương pháp chiết tách đều cho kết quả ở mô não tốt hơn ở mô thận. Phương pháp chiết tách I có hiện vạch DNA nhưng vẫn còn chứa sản phẩm thừa. Phương pháp III cho kết quả chiết tách được DNA có kích thước lớn, không chứa sản phẩm thừa và thời gian hoàn thành một mẫu chiết tách DNA nhanh hơn. Tuy nhiên, tùy vào điều kiện hóa chất hiện có mà có thể lựa chọn một trong hai phương pháp chiết tách DNA này cho phù hợp.

3.2 Qui trình PCR phát hiện *S. agalactiae*

Qui trình PCR phát hiện vi khuẩn *S. agalactiae* được thực hiện với cặp mồi F1/IMOD với qui trình đã trình bày ở mục 2.2. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *S. agalactiae* khi sử dụng cặp mồi F1/IMOD thể hiện qua Hình 2.



Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *S. agalactiae* với cặp mồi F1/IMOD

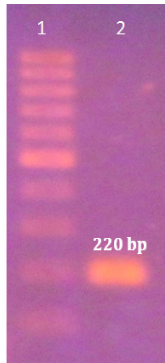
Giếng M: thang DNA 100 bp, giếng 2: mẫu vi khuẩn

Kết quả điện di sản phẩm PCR hiện vạch DNA đặc hiệu của vi khuẩn *S. agalactiae* ở vị trí 220 bp với cặp mồi F1/IMOD. Tuy nhiên, vạch sản phẩm điện di vẫn còn mờ nên cần thực hiện điều chỉnh tối ưu thêm để đạt được kết quả khuếch đại tốt hơn. Do đó, qui trình tiếp tục được điều chỉnh tối ưu phản ứng PCR phát hiện *S.agalactiae*.

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

Kết quả điện di Hình 3 cho thấy thành phần và điều kiện chu kỳ phản ứng PCR trình bày mục 2.2

không có sản phẩm không đặc hiệu, vạch sản phẩm đúng nhưng không rõ do đó tiến hành tối ưu qui trình phản ứng bao gồm: (i) tăng nồng độ môi (5pmol lên 10pmol/phản ứng), (ii) tăng nồng độ Taq (0,75U lên 1 U/phản ứng), (iii) khảo sát nhiệt độ gắn môi (60°C, 59°C, 58,3°C, 56,4°C, 53,4°C, 52,1°C, 50,3°C, 50°C), (iv) tăng chu kỳ phản ứng (30 lên 35 chu kỳ).



Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *S. agalactiae* sau khi chuẩn hóa một số thành phần của qui trình PCR

Giếng 1: thang DNA 100bp, giếng 2: mẫu vi khuẩn

Như vậy, khi tiến hành thay đổi tăng nồng độ môi, tăng nồng độ Taq, tăng nhiệt độ gắn môi 58°C, tăng chu kỳ phản ứng so với ban đầu thì vạch sản phẩm PCR hiện ra rất rõ nét và không có sản

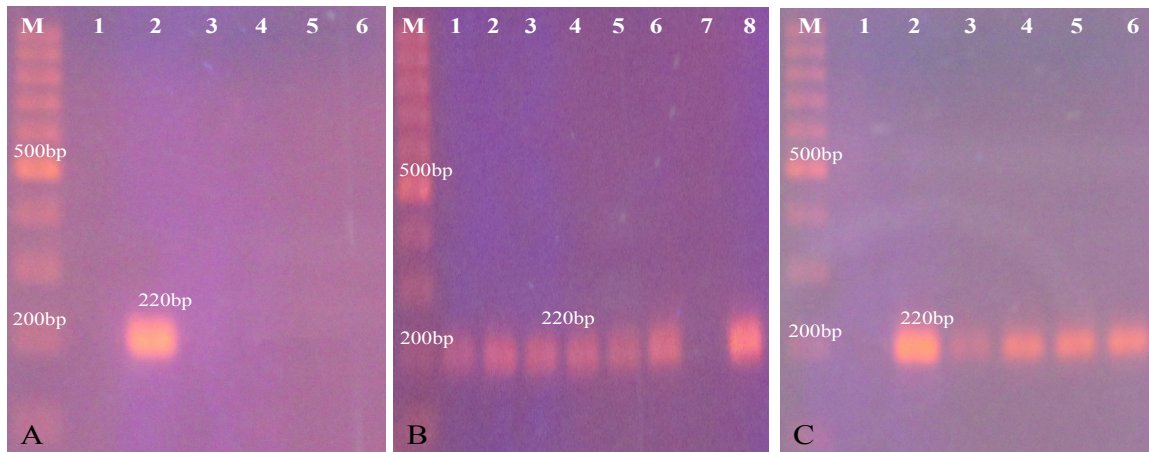
phẩm không đặc hiệu. Kết quả điện di Hình 3 cho thấy phản ứng PCR chịu ảnh hưởng bởi các thành phần tham gia phản ứng.

Theo Quyền Đình Thi và ctv. (2008) hàm lượng môi, hàm lượng Taq thấp có thể là nguyên nhân dẫn đến quá trình khuếch đại không đủ tạo ra sản phẩm. Ngoài ra, nhiệt độ gắn môi thấp dẫn đến khuếch đại sản phẩm không đặc hiệu ngược lại nhiệt độ gắn môi quá cao thì có ít sản phẩm được tạo ra. Số chu kỳ của phản ứng tỉ lệ thuận với số lượng bản sao DNA tạo ra và tăng sự rõ nét của vạch sản phẩm điện di.

3.3 Tính đặc hiệu, độ nhạy của qui trình PCR và khả năng ứng dụng của qui trình PCR phát hiện vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

Tính đặc hiệu của qui trình PCR phát hiện *S. agalactiae* được thực hiện với các chủng vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. hydrophila*, *S. iniae* và *V. harveyi*. Kết quả điện di xác định tính đặc hiệu của qui trình PCR phát hiện *S. agalactiae* thể hiện qua Hình 4A.

Kết quả điện di cho thấy, qui trình khuếch đại chỉ hiện vạch đặc hiệu ở vị trí 220 bp của vi khuẩn *S. agalactiae* mà không hiện vạch sản phẩm đối với các chủng vi khuẩn khác. Điều này đã xác định được tính đặc hiệu của qui trình khi chỉ phát hiện được vi khuẩn *S. agalactiae* mà không phát hiện được các loài vi khuẩn khác khi sử dụng môi F1/IMOD.



Hình 4: (A) Tính đặc hiệu của qui trình, giếng M: thang DNA 100 bp, giếng 1: đối chứng âm, giếng 2: đối chứng dương (*S. agalactiae*), giếng 3: *Streptococcus iniae*, giếng 4: *Edwardsiella ictaluri*, giếng 5: *Aeromonas hydrophila*, giếng 6: *Vibrio harveyi*; (B) Độ nhạy của qui trình PCR phát hiện *S. agalactiae*, giếng M: thang DNA 100 bp, giếng 1 – 6: mật độ từ 10^7 đến 10^2 cfu/0,5g mô thận, giếng 7: đối chứng âm, giếng 8: đối chứng dương; (C) Ứng dụng phát hiện nhiều chủng vi khuẩn *S. agalactiae*, giếng M: thang DNA 100 bp; giếng 1: đối chứng âm; giếng 2: đối chứng dương; giếng 3, 4, 5, 6: tương ứng với các chủng S1, S2, S4, S5

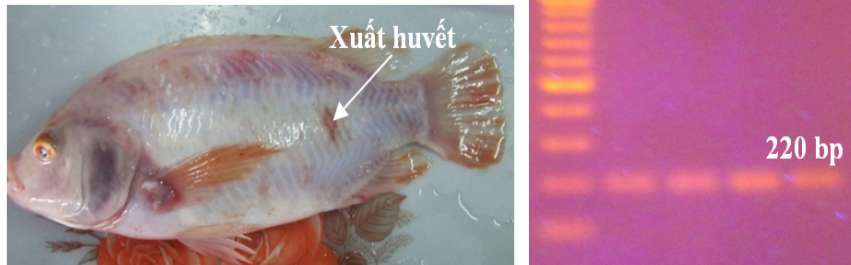
Hình 4B cho thấy các vạch sáng mờ dần cùng với sự pha loãng của mật độ vi khuẩn. Ở mật độ vi khuẩn thử nghiệm thấp nhất 10^2 cfu/0,5g mô thận, qui trình vẫn phát hiện và độ sáng của vạch sản phẩm vẫn rõ. Do đó, khả năng phát hiện vi khuẩn của qui trình có thể thấp hơn mức nhiễm 10^2 cfu/0,5g mô cá.

Tiến hành ứng dụng qui trình sau khi đã chuẩn hóa trên 1 số dòng vi khuẩn *S. agalactiae* để kiểm tra lại khả năng phát hiện *S. agalactiae* của qui trình (Hình 4C). Qua kết quả điện di cho thấy, tất cả các mẫu đều hiện vạch đặc hiệu 220 bp của *S. agalactiae*. Đây là các chủng vi khuẩn được phân

lập từ bè nuôi cá điêu hồng ở Đồng Tháp, đang bệnh phù mắt xuất huyết. Kết quả hình 4C đã xác định được khả năng phát hiện chính xác các chủng *S. agalactiae* của qui trình PCR sau khi được tối ưu hóa.

3.4 Ứng dụng qui trình PCR phát hiện *S. agalactiae* trên các mẫu cá bệnh

Tiến hành ứng dụng qui trình chiết tách DNA (Buller, 2004) và qui trình PCR sau khi đã chuẩn hóa trên một số mẫu cá điêu hồng để kiểm tra khả năng phát hiện *S. agalactiae* trực tiếp từ mẫu cá bệnh. Các mẫu cá điêu hồng có các dấu hiệu như xuất huyết, phù mắt (Hình 5).



Hình 5: Cá điêu hồng bị xuất huyết, phù mắt. Kết quả PCR phát hiện *S. agalactiae* của một số mẫu cá bệnh

Giếng M: thang DNA 100 bp; giếng 1-4 tương ứng DNA chiết tách từ cá 1- 4

Mẫu cá có dấu hiệu bệnh lý được sử dụng để ly trích DNA theo phương pháp của Buller (2004). Kết quả PCR phát hiện trên bốn mẫu cá có biểu hiện bệnh và cho kết quả dương tính (Hình 5) hiện vạch 220 bp. Vậy với qui trình này có thể ứng dụng để xét nghiệm xác định bệnh xuất huyết, phù mắt trên cá điêu hồng với tác nhân *S. agalactiae*. Đồng thời có thể ứng dụng qui trình kiểm tra chất lượng giống hay kiểm tra tình hình sức khỏe của đàn cá nuôi nhằm ngăn ngừa bệnh một cách hiệu quả.

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể chọn phương pháp ly trích DNA của Buller (2004) hoặc Taggart *et al.*, (1992) từ mô não hoặc mô thận của mẫu cá điêu hồng bệnh. Kết quả ghi nhận qui trình PCR sử dụng cặp mồi F1/IMOD cho phép phát hiện *S. agalactiae* từ mẫu cá bệnh thu ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long, giúp rút ngắn thời gian chẩn đoán và có tính chính xác cao. Qui trình rút ngắn được thời gian phân tích và có thể phát hiện vi khuẩn với mật độ thấp nên có ý nghĩa rất lớn trong

chẩn đoán bệnh, phục vụ cho các thí nghiệm chuyên sâu nghiên cứu về *S. agalactiae*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Amal, M.N.A and M. Zamri-saad, 2011. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review. *Pertanika Journal Tropical Agriculture Sciences* 34 (2): 195 – 206.
2. Brian, S., 2009. Streptococcosis in Tilapia: A more Complex problem. Intervet/Schering-Plough Animal Health, Singapore.
3. Buller, N.B., 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. CABI Publishing. p. 15-29.
4. Channarong, R., K. Pattanapon, P. Nopadon and W. Janenuj, 2012. Duplex PCR for simultaneous and unambiguous detection of *Streptococcus iniae* and *S. agalactiae* associated with Streptococcosis of culture

- Tilapia in Thailand. Thai Journal Vet Medicine 42 (2): 153-158
5. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012. Phân lập và xác định đặc điểm của vi khuẩn *S. agalactiae* từ cá điều hồng (*Oreochromis sp.*) bệnh phù mắt và xuất huyết. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ 22c: 203 – 212.
 6. Maisak, H., B. Patamalai, A. Amonsin and J. Wongtawatchai, 2008. Streptococcosis in Thai Culture Tilapia *Oreochromis nilotica*. Proceedings 7th Chula. Univ. Vet. Sciences Annual Congress, 1 May, 2008.
 7. Monfared, S.R., A.R. Mirvaghefi, H. Farahmand, M.A. Nematollahi and S.A. Pour Bakhsh, 2011. PCR assay for experimental detection of *S. agalactiae* based on *ScpB* gene in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fisheries International 6 (4): 75 – 79.
 8. 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.
 9. Taggart, J. B., Hynes, R. A., Prodhon, P. A., 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. Journal of Fish Biology: 40, 963–965.