



PHÁT HIỆN VI KHUẨN *Vibrio harveyi* VÀ *Streptococcus agalactiae* BẰNG PHƯƠNG PHÁP PCR KHUẨN LẠC

Trần Thị Tuyết Hoa¹

¹ Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 10/6/2014

Ngày chấp nhận: 04/8/2014

Title:

Detection of *Vibrio harveyi* and *Streptococcus agalactiae* by colony PCR

Từ khóa:

PCR khuẩn lạc, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio harveyi*

Keywords:

Colony PCR, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio harveyi*

ABSTRACT

The study tested two PCR procedures: (i) colony PCR procedure allows detection of luminous bacteria on black tiger shrimp (*Vibrio harveyi*) directly from the colony without DNA extraction stage. The first process uses primers F6, R4 designed from *vhh* gene, a specific gene of *V. harveyi*. Electrophoresis results gave a band of 159 bp, positive for *V. harveyi*; (ii) Another colony PCR procedure detect streptococcosis on red tilapia (*Streptococcus agalactiae*) directly from the colony without DNA extraction stage. The process uses primers F1, IMOD designed from 16S rRNA, gene sequences specific for *S. agalactiae*. Electrophoresis results gave a band of 220 bp, positive for *S. agalactiae*. The total amplification time was about 3 hours.

TÓM TẮT

Nghiên cứu thử nghiệm hai qui trình: (i) qui trình PCR khuẩn lạc cho phép phát hiện vi khuẩn gây bệnh phát sáng trên tôm sú (*V. harveyi*) trực tiếp từ khuẩn lạc không qua giai đoạn tách chiết ADN. Qui trình sử dụng đoạn mỗi F6, R4 trong đoạn gen *vhh*, đoạn gen này được xem là đặc hiệu cho *V. harveyi*. Kết quả điện di cho vạch 159 bp, vạch dương tính với *V. harveyi*; (ii) qui trình PCR khuẩn lạc phát hiện vi khuẩn gây bệnh phù mắt xuất huyết trên cá điêu hồng (*S. agalactiae*) trực tiếp từ khuẩn lạc không qua giai đoạn tách chiết ADN. Qui trình sử dụng đoạn mỗi F1, IMOD thiết kế từ trình tự gen 16S rRNA đặc hiệu cho *S. agalactiae*. Kết quả điện di cho vạch 220 bp, vạch dương tính với *S. agalactiae*. Qui trình có tổng thời gian khuếch đại khoảng 3 giờ.

1 GIỚI THIỆU

Việt Nam là một trong những quốc gia có nhiều tiềm năng về thủy sản cả về lĩnh vực khai thác và nuôi trồng. Đồng bằng sông Cửu Long được biết đến là vùng cung cấp thủy sản lớn nhất nước, đa dạng về hình thức nuôi và có hơn 1.200.000 ha nuôi thủy sản chiếm khoảng 60% tổng diện tích nuôi cả nước; là một trong những khu vực có thể mạnh về nuôi tôm, nuôi cá đã có từ rất lâu đời. Tôm sú (*Penaeus monodon*), cá tra (*Pangasius*

hypophthalmus), cá điêu hồng (*Oreochromis sp*), cá rô đồng (*Anabas testudineus*)... là đối tượng nuôi chính của vùng, là sản phẩm có giá trị kinh tế cao. Tuy nhiên, việc gia tăng mật độ nuôi trong mô hình nuôi thủy sản hiện nay đã gây nên những tác động xấu đến môi trường, dịch bệnh xảy ra thường xuyên và gây thiệt hại cho nhiều cho người nuôi. Bên cạnh các tác nhân nấm, ký sinh trùng, virus... thì tác nhân vi khuẩn đã và đang gây thiệt hại lớn đến năng suất ở các mô hình nuôi tôm, cá. Cụ thể, các bệnh vi khuẩn thường gặp ở các vùng nuôi

thủy sản bao gồm: bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm do *Vibrio parahaemolyticus* (Loc Tran *et al.*, 2013), bệnh phát sáng trên tôm do *V. harveyi* (Pass *et al.*, 1987; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990), bệnh gan thận mũ trên cá tra do *Edwardsiella ictaluri* (Crumlish *et al.*, 2002), bệnh xuất huyết phù mắt trên cá điêu hồng do *S. agalactiae* (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012) và bệnh đen thân trên cá rô đồng do *Streptococcus iniae* gây ra (Tu Thanh Dung *et al.*, 2013)... Vì thế, việc phòng và trị bệnh vi khuẩn gây ra cho các đối tượng nuôi thủy sản đang được quan tâm chú trọng, cụ thể là nghiên cứu tìm ra các phương pháp xét nghiệm nhanh, chính xác để góp phần cho công tác quản lý dịch bệnh vi khuẩn được thực hiện có hiệu quả.

Phương pháp phổ biến dùng để định danh vi khuẩn gây bệnh trên các đối tượng nuôi thủy sản là phương pháp sinh hóa truyền thống hoặc sử dụng bộ kit API20E/API20 Strep (BioMerieux). Tuy nhiên, các phương pháp này cần nhiều thời gian cho phân lập, nuôi cấy và định danh vi khuẩn. Thời gian sử dụng cho phương pháp này thường kéo dài khoảng 4 – 5 ngày nên không đáp ứng được cho yêu cầu chẩn đoán bệnh hiện nay.

Gần đây, một trong những phương pháp sinh học phân tử giúp rút ngắn thời gian phát hiện vi khuẩn đã được phát triển; trong đó phổ biến và dễ áp dụng là phương pháp PCR. Phương pháp PCR hiện nay được ứng dụng rộng rãi trong ngành nuôi trồng thủy sản nhằm kiểm tra chất lượng giống, chẩn đoán một số bệnh tôm, cá... Phương pháp cho kết quả nhanh và đáng tin cậy. Phương pháp PCR khuẩn lạc (Colony PCR) là một loại biến thể của phương pháp PCR có khả năng phát hiện, định danh vi khuẩn gây bệnh trực tiếp từ khuẩn lạc mà không qua giai đoạn chiết tách ADN hay kiểm tra sinh hóa. Do vậy, qui trình PCR khuẩn lạc giúp phát hiện vi khuẩn trong thời gian ngắn, chính xác tác nhân gây bệnh nhờ vào tính đặc hiệu của qui trình. Trên cơ sở đó, nghiên cứu “Ứng dụng qui trình PCR khuẩn lạc (colony PCR) định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trên cá, tôm nuôi” được thực hiện. Nghiên cứu được khảo sát thực hiện với đại diện vi khuẩn *V. harveyi* gây bệnh phát sáng trên tôm và *S. agalactiae* gây bệnh phù mắt, xuất huyết ở cá điêu hồng.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu vật dùng cho nghiên cứu bao gồm các nguồn: (i) Mẫu vi khuẩn đã được định danh là vi

khuẩn *S. agalactiae* (mã số SaS.3) từ bộ sưu tập của Khoa Thủy sản; (ii) Mẫu vi khuẩn đã được định danh là vi khuẩn *V. harveyi* (mã số T2007-05) từ bộ sưu tập của Khoa Thủy sản.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Phục hồi và nuôi tăng sinh vi khuẩn

Vi khuẩn *V. harveyi* được phục hồi trên môi trường Nutrient agar (1,5% NaCl) ở nhiệt độ 28°C. Sau 24 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 lỏng NB trong vòng 24 giờ. Ngoài ra, kiểm tra một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa cơ bản của chủng vi khuẩn *V. harveyi* thí nghiệm.

Vi khuẩn *S. agalactiae* được phục hồi trên môi trường Brain heart infusion agar 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 lỏng BHIB trong vòng 48 giờ. Ngoài ra, kiểm tra một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa cơ bản của chủng vi khuẩn *S. agalactiae* thí nghiệm.

Chiết tách ADN của vi khuẩn (*V. harveyi*, *S. agalactiae*): Nuôi tăng sinh vi khuẩn (16 - 48 giờ) trong 5ml NB (có bổ sung 1,5% NaCl đối với *V. harveyi*). Lấy 1,5 ml dung dịch vi khuẩn ly tâm 5.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C rút bỏ phần dịch nổi, rửa viên kết tủa với 500 µl nước muối 0,9% NaCl và tiếp tục ly tâm, loại bỏ phần dịch nổi. Cho vào 100 µl nước cất tiệt trùng và ủ ở 100°C trong 10 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút và lấy phần dịch nổi sử dụng cho phản ứng PCR (Pang *et al.*, 2006).

Qui trình PCR khuẩn lạc phát hiện *V. harveyi*:

Vi khuẩn *V. harveyi* được cấy lên môi trường thạch NA (1,5% NaCl) ủ 28°C trong vòng 24 giờ. Sử dụng trực tiếp vi khuẩn mọc trên đĩa thạch cho vào thành phần phản ứng PCR với trình tự 2 đoạn mỗi dùng khuếch đại *V. harveyi* bao gồm: F6: 5'-TGGATGTTAAATGAGTTTGG-3' và R4: 5'-CGTTACGATTATTTGATAG-3' (Sun *et al.*, 2009). Qui trình được thực hiện với điều kiện phản ứng: 1X PCR buffer; 1,5 mM MgCl₂; 200µM dNTPs; 1U Taq DNA polymerase; 10 pmol mỗi F6, 10 pmol mỗi R4; 1 khuẩn lạc vi khuẩn cần xác định là *V. harveyi*. Tổng thể tích của phản ứng là 20 µl. Điều kiện phản ứng: 94°C trong 4 phút, tiếp theo 94°C trong 40 giây, 52°C trong 1 phút, 72°C trong 30 giây chu kỳ này được lặp lại 30 lần, cuối cùng 72°C trong 7 phút.

Qui trình PCR khuẩn lạc phát hiện *S. agalactiae*: Vi khuẩn *S. agalactiae* được cấy lên môi trường thạch BHIA ủ 37°C trong vòng 48 giờ. Sử dụng trực tiếp vi khuẩn mọc trên đĩa thạch cho vào thành phần phản ứng PCR với trình tự 2 đoạn mỗi dùng khuếch đại *S. agalactiae* bao gồm: F1 (5' GAG TTT GAT CAT GGG TCA G 3') VÀ IMOD (5' ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC 3') (Channarong *et al.*, 2012). Qui trình được thực hiện với điều kiện phản ứng: 1X PCR buffer; 2 mM MgCl₂; 200 μM dNTPs; 10 pmol mỗi F1 và 10 pmol mỗi IMOD; 1U Taq ADN polymerase; 1 khuẩn lạc vi khuẩn cần xác định là *S. agalactiae*. Tổng thể tích của phản ứng là 25 μl. Điều kiện phản ứng: 95°C trong 5 phút; tiếp theo 95°C trong 60 giây, 58°C trong 60 giây, 72°C trong 60 giây chu kỳ này được lặp lại 35 lần; cuối cùng là 72°C trong 7 phút.

Điện di: Sản phẩm PCR được điện di bằng gel agarose (1,5%) có chứa 0,5 μl EtBr (ethidium bromide) trong dung dịch 0,5X TAE (Tri-acetate-EDTA) ở 90V, đọc kết quả bằng bàn đọc UV.

Đọc kết quả: Kích thước sản phẩm PCR được xác định dựa vào thang ADN 100bp (hay 1kb plus) với: (i) *V. harveyi* có vạch sản phẩm 159 bp; (ii) *S.*

agalactiae có vạch sản phẩm 220 bp.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

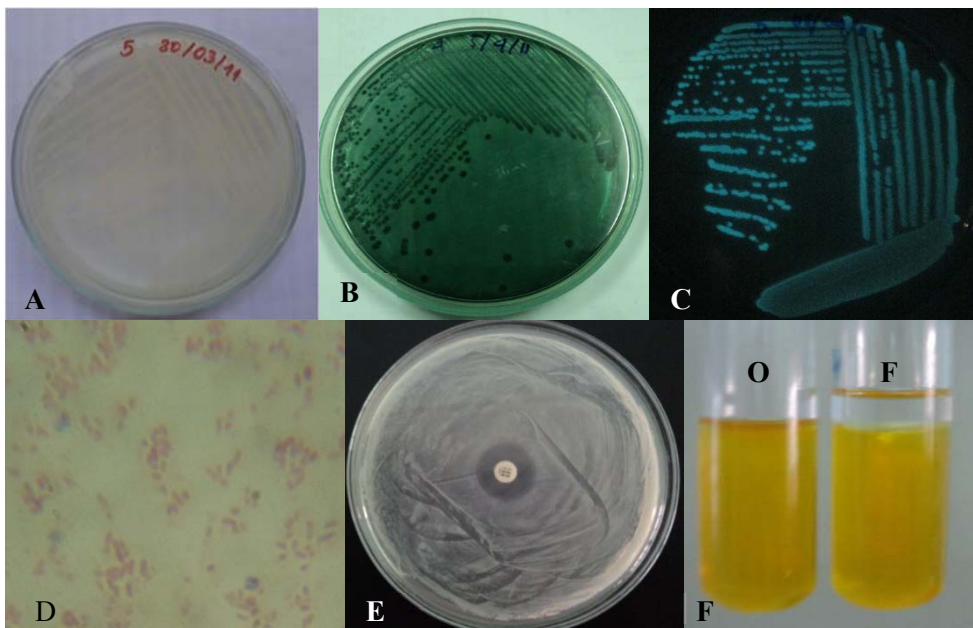
3.1 Qui trình PCR khuẩn lạc phát hiện vi khuẩn phát sáng *V. harveyi*

Chủng vi khuẩn phát sáng *V. harveyi* (mã số T2007-05) được phục hồi trên môi trường NA (có bổ sung 1,5 % NaCl). Chủng vi khuẩn được cấy kiểm tra trên môi trường TCBS, môi trường phát quang và đồng thời kiểm tra một số chỉ tiêu sinh hóa cơ bản (Bảng 1, Hình 1).

Bảng 1: Một số đặc điểm sinh hóa chủng vi khuẩn T2007-05

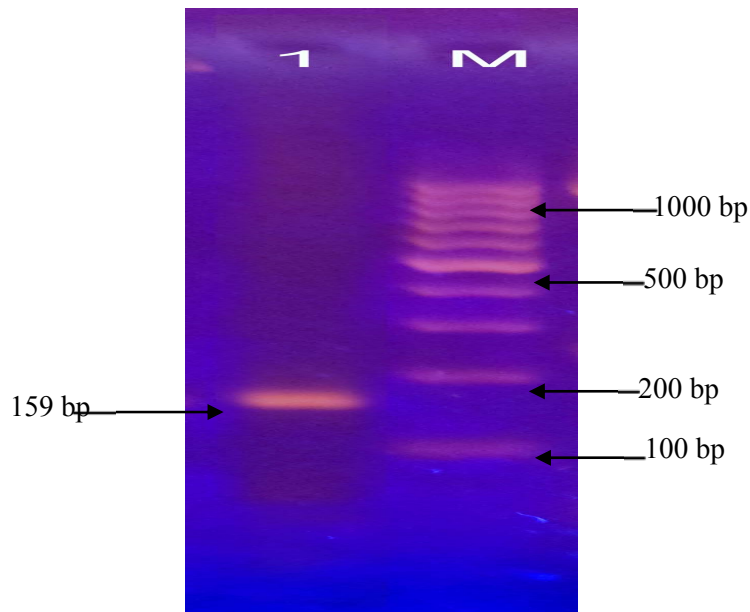
Chỉ tiêu	T2007-05
Nhuộm Gram	âm
Hình dạng	que ngắn
Di động	+
Catalase	+
Oxidase	+
O/F	+/+
môi trường TCBS	Mọc khuẩn lạc xanh
Môi trường phát quang	Vi khuẩn phát quang
O/129 (150 μg)	+

+ : kết quả phản ứng là dương tính



Hình 1: Hình khuẩn lạc và các phản ứng sinh hóa của chủng vi khuẩn thử nghiệm

(A) *V. harveyi* trên NA+, (B) trên TCBS, (C) trên môi trường phát quang, (D) hình nhuộm Gram, (E) O/129 (E), (F) O/F.



Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *Vibrio harveyi*

Giếng M: thang ADN 100bp
Giếng 1: mẫu T2007-05

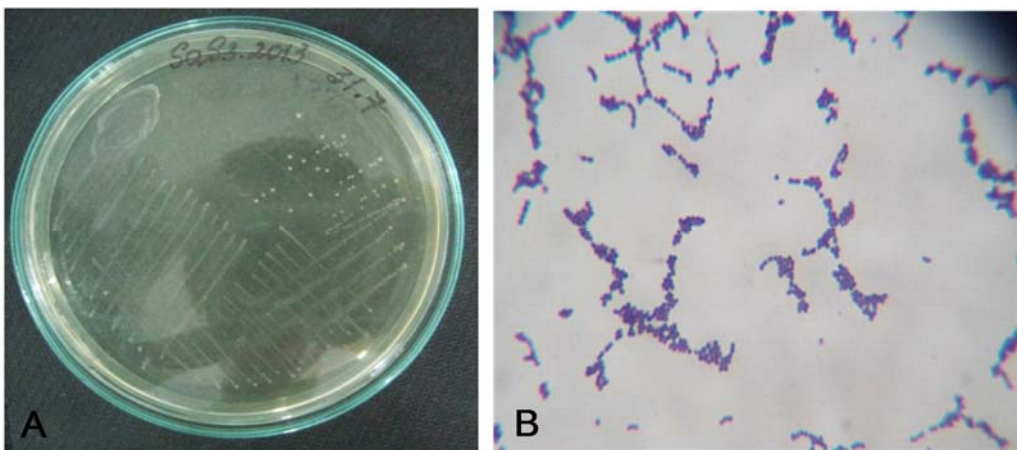
Các kết quả phản ứng sinh hóa trên cho thấy chủng vi khuẩn T2007-05 có các đặc điểm sinh hóa của giống *Vibrio*, do vậy được chọn để thực hiện quy trình PCR khuẩn lạc phát hiện *V. harveyi*.

Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 2) với vạch sáng có trọng lượng phân tử 159bp cho thấy khả năng phát hiện vi khuẩn *V. harveyi* của quy trình PCR khuẩn lạc với cặp mồi F4, R6 (Sun *et al.*, 2009). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả của Sun *et al.* (2009). Sản phẩm PCR ở giếng 1 hiện vạch rất rõ và sáng qua đó cho thấy khả năng sử dụng quy trình PCR khuẩn lạc trong việc định

danh vi khuẩn *V. harveyi*.

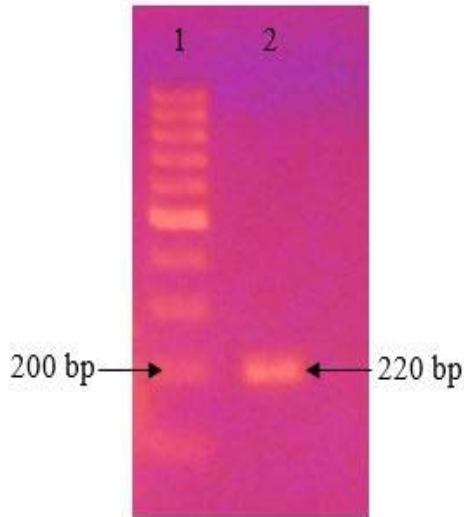
3.2 Quy trình PCR khuẩn lạc phát hiện vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

Vi khuẩn *S. agalactiae* được phục hồi trên môi trường BHIA sau 48 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C (Hình 3A). Kết quả kiểm tra một số chỉ tiêu hình thái, vi khuẩn tạo khuẩn lạc tròn nhỏ, màu trắng đục, nhỏ li ti. Chủng vi khuẩn có các đặc điểm: Gram dương, hình cầu kết chuỗi (Hình 3B), không di động, âm tính với Oxidase và Catalase. Vi khuẩn này được sử dụng cho phản ứng PCR khuẩn lạc định danh *S. agalactiae*.



Hình 3: Vi khuẩn *S. agalactiae* sử dụng trong nghiên cứu. (A) Hình vi khuẩn *S. agalactiae* trên môi trường BHIA; (B) Kết quả nhuộm Gram vi khuẩn *S. agalactiae* (100X)

Một khuẩn lạc của chủng vi khuẩn SaS3 được cho trực tiếp vào thành phần hóa chất trình bày mục 2.2 và phản ứng PCR khuẩn lạc được thực hiện với điều kiện phản ứng trình bày ở mục 2.2. Kết quả của quy trình PCR khuẩn lạc định danh vi khuẩn *S. agalactiae* được ghi nhận qua Hình 4.



Hình 4: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *S. agalactiae*

Giếng 1: thang ADN 100 bp, giếng 2: mẫu vi khuẩn SaS3

Kết quả điện di Hình 4 cho thấy giếng số 2 có hiện vạch sản phẩm PCR ở vị trí 220 bp, vạch sản phẩm của *S. agalactiae* với mỗi F1/IMOD. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả của Channarong *et al.* (2012). Sản phẩm PCR ở giếng 2 hiện vạch rất rõ và sáng, không có sản phẩm không đặc hiệu, qua đó cho thấy khả năng sử dụng qui trình PCR khuẩn lạc trong việc định danh vi khuẩn *S. agalactiae*.

Kết quả ghi nhận từ hai qui trình cho thấy khả năng ứng dụng của qui trình PCR khuẩn lạc trong việc phát hiện vi khuẩn *V. harveyi* và *S. agalactiae*. Định danh chính xác tên loài vi khuẩn gây bệnh với phương pháp PCR khuẩn lạc không qua giai đoạn kiểm tra với các phản ứng sinh hóa. Fukui và Sawabe (2007) cũng đã sử dụng qui trình PCR khuẩn lạc giúp định danh vi khuẩn *V. harveyi* mà không cần tách chiết ADN, hoặc sự hỗ trợ của các xét nghiệm sinh hóa. Bên cạnh đó, Fukui và Sawabe (2007) đã ghi nhận độ đặc hiệu và nhanh chóng của phép thử là đủ tin cậy và có thể giúp dự

đoán sự bùng phát gây chết hàng loạt do *V. harveyi* trong nuôi trồng thủy sản.

Như vậy, có thể tiếp tục thử nghiệm ứng dụng qui trình PCR khuẩn lạc trong phát hiện các vi khuẩn gây bệnh cho động vật thủy sản khác (*Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mù ở cá tra, *Aeromonas hydrophila* gây bệnh xuất huyết ở cá tra và *Streptococcus iniae* gây bệnh đen thân trên cá rô đồng).

4 KẾT LUẬN

Qui trình PCR khuẩn lạc cho phép phát hiện, định danh chính xác vi khuẩn *V. harveyi* gây bệnh phát sáng trên tôm, vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh phù mắt xuất huyết trên cá điêu hồng.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin cảm ơn sinh viên Bùi Thị Ngân, lớp Bệnh học Thủy sản K35 và học viên Dương Thành Long, lớp cao học thủy sản K20 đã tham gia quá trình phân tích mẫu dùng trong nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Channarong, R., K. Pattanapon, P. Nopadon and W. Janenuj, 2012. Duplex PCR for simultaneous and unambiguous detection of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* associated with Streptococcosis of culture Tilapia in Thailand. Thai Journal Vet Medicine 2012. 42 (2): 153-158
2. Crumlish, M., Dung, T. T., Turnbull, J. F., Ngoc, N. T. N. and Ferguson, H. W. 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. Journal of Fish Diseases 25: 733-736.
3. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012. Phân lập và xác định đặc điểm của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* từ cá điêu hồng (*Oreochromis sp.*) bệnh phù mắt và xuất huyết. Tạp chí Khoa học 2012: 22c 203 – 212. Trường Đại học Cần Thơ.
4. Fukui Y, Sawabe T (2007) Improved one step colony PCR for detection of *Vibrio harveyi*. Microbes Environment 22: 1-10.
5. Lavilla-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda, L.D. Dela-Pena. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. Aquaculture 91: 1-13.

6. Loc Tran, Linda Nunan, Rita M. Redman, Leone L. Mohney, Carlos R. Pantoja, Kevin Fitzsimmons, Donald V. Lightner. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organism* 105: 45–55.
7. Pang, L., X.H. Zhang, Y. Zhong, J. Chen, Y. Li, B. Austin. 2006. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Applied Microbiology*. 43:249-255.
8. Pass, D.A., R. Dybdahl, M.M. Mannion. 1987. Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. *Aquaculture* 65:149-169.
9. Sun, K., Y.H. Hu, X.H. Zhang, F.F. Bai, L. Sun. 2009. Identification of *vhhP2*, a novel genetic marker of *V. harveyi*, and its application in the quick detection of *V.harveyi* from animal specimens and environmental. *Applied Microbiology*. 107:1251-1257.
10. 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.