

CHUẨN HÓA QUI TRÌNH mPCR PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI VI KHUẨN *EDWARDSIELLA ICTALURI*, *AEROMONAS HYDROPHILA* VÀ *FLAVOBACTERIUM COLUMNARE* TỪ MÁU CÁ TRA (*PANGASIANODON HYPOPHthalmus*)

Trần Nguyễn Diễm Tú¹ và Đặng Thị Hoàng Oanh¹

ABSTRACT

mPCR protocol for simultaneous detection of *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare* infection using blood samples from stripped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) was optimized. The mPCR product has three bands 407 bp, 209 bp and 504 bp for *E. ictaluri*, *A. hydrophila* and *F. columnare*, respectively. The lowest detection limit of mPCR protocol was 1.5×10^5 CFU/ml for *E. ictaluri* and *F. columnare* and 1.5×10^6 CFU/ml for *A. hydrophila* in 100 μ l catfish blood sample. The diagnostic sensitivity and specificity of the PCR was evaluated with common bacterial isolates in aquaculture including *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *Aeromonas sorbia*; *A. carviae*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. The mPCR protocol was simultaneously used to detect respective bacteria in blood samples of experimental injection catfish. The obtained results showed that optimized PCR protocol can be used as a non destructive method for rapid, sensitive and specific detection of bacterial infection in catfish.

Keywords: *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare* *Pangasianodon hypophthalmus*, mPCR, diagnosis

Title: Optimization of mPCR protocols for simultaneous detection of *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare* from blood samples of stripped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)

TÓM TẮT

Qui trình mPCR phát hiện đồng thời vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila* và *Flavobacterium columnare* từ máu cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) được chuẩn hóa. Sản phẩm PCR hiện đồng thời ba vạch ở ba vị trí 407 bp (*E. ictaluri*), 209 bp (*A. hydrophila*) và 504 bp (*F. columnare*). Giới hạn phát hiện thấp nhất của qui trình đối với *E. ictaluri* và *F. columnare* là 1.5×10^5 CFU/ml, đối với là *A. hydrophila* là 1.5×10^6 CFU/ml trong 100 μ l máu cá. Tính đặc hiệu của qui trình được kiểm tra với vi khuẩn *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *Aeromonas sorbia*; *A. carviae*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. Qui trình được sử dụng để phát hiện các vi khuẩn tương ứng trong mẫu máu cá cảm nhiễm vi khuẩn. Kết quả cho thấy qui trình có thể phát hiện nhanh, nhạy và đặc hiệu mẫu máu cá tra nhiễm khuẩn nhưng vẫn giữ sống mẫu xét nghiệm.

Từ khoá: *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium columnare*, cá tra, PCR đa môi, chẩn đoán

1 GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây nghề nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) được thâm canh hóa đặc biệt là nuôi với mật độ cao nên vấn đề dịch bệnh xảy ra thường

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

xuyên hơn và gây thiệt hại nặng nề hơn. Gần đây bệnh do vi khuẩn đang gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất và sản lượng cá nuôi. Tuy nhiên, quản lý dịch bệnh kém hiệu quả đang là vấn đề quan tâm hàng đầu của người nuôi cá mà một trong những nguyên nhân ảnh hưởng là do xác định tác nhân nhân gây bệnh chậm và kém chính xác. Hiện nay phương pháp phát hiện mầm bệnh vi khuẩn ở động vật thủy sản được sử dụng phổ biến là phương pháp sinh hóa truyền thống hay sử dụng kit API 20E (BioMerieux), phương pháp PCR đơn môi hay đa môi. Trong đó phương pháp PCR sử dụng DNA chiết tách từ thận cá nhiễm khuẩn cho phép phát hiện đồng thời nhiều mầm bệnh vừa nhanh, chính xác và ít tốn kém. Tuy nhiên, sử dụng mẫu thận để xét nghiệm sẽ làm chết mẫu nên không thể áp dụng trong trường hợp xét nghiệm chọn giống đối với cá bố mẹ hay trong trường hợp cần giữ mẫu còn sống. Trong nghiên cứu này, qui trình mPCR phát hiện đồng thời ba loài vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila* và *Flavobacterium columnare* từ máu cá tra được chuẩn hóa và ứng dụng để phát hiện nhanh và nhạy ba loại vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* nhiễm trên cá tra nhưng không làm chết cá nhất là đối với cá tra bố mẹ cho sinh sản.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Cá tra giống có trọng lượng từ 20-25g/con, da sáng, phản ứng linh hoạt. Các chủng vi khuẩn *E. ictaluri* (Eic-CA3.1G), *A. hydrophila* (Ahy-CA1.2T) và *F. columnare* (CAF-09-Fcol-M1) từ bộ sưu tập vi khuẩn của Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Các chủng được phục hồi và nuôi tăng sinh trong môi trường NB (nutrient broth) đối với *E. ictaluri* và *A. hydrophila* và môi trường CB (cytopha broth) đối với *F. columnare* từ 24-48 giờ ở 28°C tùy theo loài vi khuẩn. Sau khi nuôi tăng sinh, mật độ vi khuẩn được đo bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 540 nm. Mật độ *F. columnare* là 10^9 CFU/ml khi OD=0.7 ± 0.02, mật độ *E. ictaluri* và *A. hydrophila* là 10^9 CFU/ml với OD=1 ± 0.02.

Phương pháp chiết tách DNA từ máu cá được thực hiện theo Bilodeau *et al.* (2005) có điều chỉnh (Trần Nguyễn Diễm Tú và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011). Máu cá được lấy bằng kim tiêm 1 ml có sử dụng heparin (Leal-Klevezas *et al.*, 1995). 100 µl mẫu máu được ly tâm ở 4000xg trong 3 phút. Phần viên sau khi ly tâm được hòa tan trong 250 µl dung dịch lysis erythrocyte (155mM NH₄Cl, 10mM NaHCO₃, 100mM EDTA), sau đó ly tâm 4000xg trong 3 phút. Quá trình này được lặp lại cho đến khi thu được phần viên không màu. Sau đó 200 µl dung dịch lysis buffer (10 mM Tris-HCL có pH=8, 0,5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1% SDS) và 4 µl proteinase K (5 mg/µl) được thêm vào phần viên và ủ ở 50°C trong 30 phút. Tiếp đến, 400 µl dung dịch phenol bão hòa (pH=8) được thêm vào, lắc kỹ và ly tâm 8000xg trong 5 phút. Phần dịch phía trên được chuyển sang ống tuýp mới, sau đó thêm 400 µl chloroform:isoamylalcohol (24:1) và ly tâm 8000xg trong 5 phút. Phần dịch ở trên được chuyển sang ống típ mới có chứa 200 µl NH₄Oac (7,5 M), giữ lạnh bằng nước đá trong 10 phút sau đó li tâm 8000xg trong 5 phút. Phần dịch ở trên lại được chuyển sang ống típ mới có chứa ethanol (95%) với tỉ lệ 1 mẫu và 2 ethanol rồi ủ ở -80°C, ly tâm 8000xg trong 5 phút. Phần dịch nổi được bỏ đi và

phần viên được rửa trong 1ml ethanol (70%). Sau đó phần còn được loại bỏ và phần viên được để khô ở nhiệt độ phòng rồi hòa tan bằng 15 µl H₂O và trữ ở -20°C. Hàm lượng DNA được xác định bằng máy so màu quang phổ với bước sóng 260 nm.

Dựa theo ba qui trình PCR đơn phát hiện *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* từ thận và máu cá tra (Panangala *et al.*, 2007; Trần Nguyễn Diễm Tú và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2011) qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* được thực hiện gồm dung dịch đệm 10X; MgCl₂; dNTPs; Taq DNA polymerase; mỗi xuôi (EiFd-1); mỗi ngược (EiRs); mỗi xuôi (AeroFd); mỗi ngược (AeroRs), (FcFd); (FcRs) (Panangala *et al.*, 2007) và 500 ng DNA được chiết tách từ máu cá có chứa vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare*. Thí nghiệm xác định độ nhạy được thực hiện bằng cách pha loãng vi khuẩn từ 10⁹ đến 10¹ CFU/ml rồi trộn với mẫu máu theo tỉ lệ thích hợp. Sau đó 450 µl hỗn hợp vi khuẩn được trộn với 100 µl máu rồi chiết tách DNA. Hàm lượng DNA được đo bằng máy so màu quang phổ và pha loãng ở hàm lượng 500 ng. Thí nghiệm xác định tính đặc hiệu của qui trình mPCR được thực hiện với các loài vi khuẩn: *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *Aeromonas sorbia*; *A. carviae*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được điện di trên gel 1% agarose (Abgene, UK) trong dung dịch đệm TAE 0.5X (10 mM Tris, 5 mM acetate, 0.1 mM EDTA). Kết quả điện di được ghi nhận bằng bàn đọc UV. Căn cứ vào thang DNA chuẩn để xác định trọng lượng phân tử. Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu với DNA của *E. ictaluri* là 407bp, *A. hydrophila* là 209 bp và *F. columnare* là 504 bp.

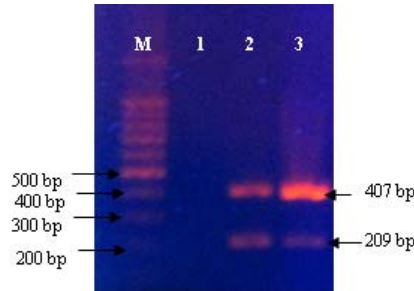
Thí nghiệm gây cảm nhiễm được thực hiện trên cá tra khỏe có trọng lượng khoảng 20-25g/con, da sáng, phản ứng linh hoạt, được kiểm tra ký sinh trùng và vi khuẩn tiến hành bố trí thí nghiệm. Thí nghiệm được bố trí 4 bể: bể 1 tiêm vi khuẩn *E. ictaluri* (10⁶ CFU/ml), bể 2 tiêm vi khuẩn *A. hydrophila* (10⁶ CFU/ml), bể 3 tiêm vi khuẩn *F. columnare* (10⁶ CFU/ml). Bể 4 tiêm 3 vi khuẩn (trộn 3 vi khuẩn *E. ictaluri* (10⁶ CFU/ml), *A. hydrophila* (10⁶ CFU/ml) và *F. columnare* (10⁶ CFU/ml) với tỉ lệ 1:1:1). Cá được bố trí vào bể nhựa (thể tích 60L được chứa nước 2/3 thể tích bể) với mật độ 5 con /bể. Vi khuẩn được tiêm ở góc vi ngực với liều lượng 100 µl/cá. Cá có dấu hiệu bệnh lý hoặc cá lờ đờ được tái phân lập vi khuẩn, lấy mẫu máu để phân tích PCR.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

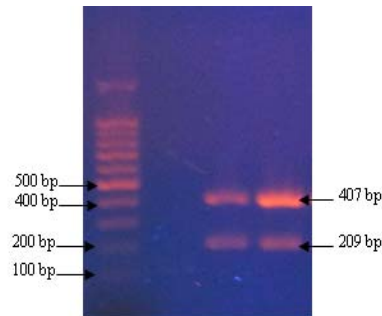
3.1 Qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

Qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* từ máu cá tra được thực hiện dựa trên hai qui trình PCR đơn mỗi phát hiện *E. ictaluri* và *A. hydrophila* (Đặng Thị Hoàng Oanh và Đặng Thụy Mai Thy, 2009; Nguyễn Hà Giang *et al.*, 2010) gồm 1X dung dịch đệm; 1.5mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 0.5U Taq DNA polymerase; 0.4 µM mỗi xuôi (EiFd-1); 0.4 µM mỗi ngược (EiRs); 0.5 µM mỗi xuôi (AeroFd); 0.5 µM mỗi ngược (AeroRs) và 500ng mẫu DNA chiết tách từ máu cá. Chu kì nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 4 phút; sau đó 95°C trong 30 giây; 58°C trong 45 giây; 72°C trong 30 giây; lặp lại chu kì trên 30 lần; 72°C trong 10 phút.

Kết quả điện di sản phẩm mPCR mẫu DNA chiết tách từ máu cá trộn với vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* (với tỉ lệ 1 *E. ictaluri* : 1 *A. hydrophila*) hiện vạch 407 bp đặc hiệu của *E. ictaluri* và vạch 209 bp đặc hiệu của *A. hydrophila* (Giếng 3, Hình 1). Tuy nhiên, vạch đặc hiệu của *A. hydrophila* mờ hơn vạch đặc hiệu của *E. ictaluri*, mẫu hiện vạch mờ có thể do chu kì nhiệt không phù hợp với môi, hàm lượng *Taq* polymerase không thích hợp cho việc tổng hợp nên các đoạn DNA mới, hàm lượng DNA hay một số thành phần khác của phản ứng chưa được tối ưu. Qui trình được điều chỉnh bằng cách tăng hàm lượng DNA của *A. hydrophila* để tăng mức độ tiếp xúc của cặp môi AeroFd và AeroRs đặc hiệu với gen Aerolysin của vi khuẩn *A. hydrophila*. DNA mẫu được tăng bằng cách trộn 100µl máu với vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* theo tỉ lệ: 1 *E. ictaluri* : 2 *A. hydrophila*. Kết quả điện di sản phẩm mPCR cho kết quả hiện vạch *A. hydrophila* rõ hơn và không phát hiện sản phẩm không đặc hiệu (giếng 3, Hình 2).



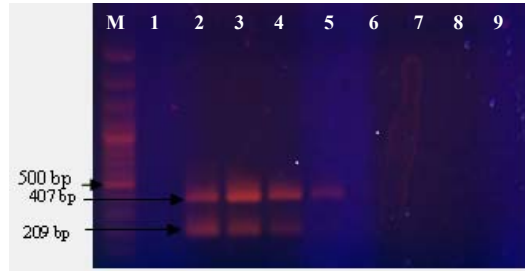
Hình 1: Sản phẩm mPCR phát hiện *E. ictaluri* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2: đối chứng dương (vi khuẩn); Giếng 3: mẫu DNA chiết tách từ máu cá có trộn với vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* (tỉ lệ 1:1)



Hình 2: Sản phẩm mPCR phát hiện *E. ictaluri* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và vi khuẩn Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2: đối chứng dương (vi khuẩn); Giếng 3: mẫu DNA chiết tách từ máu cá có trộn với vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* (tỉ lệ 1:2)

Kết quả xác định độ nhạy của qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *A. hydrophila* cho thấy qui trình có thể phát hiện được vi khuẩn *E. ictaluri* ở mật độ thấp nhất là 2.25×10^5 CFU/ml trong 100 µl máu cá (giếng 5, Hình 3) và phát hiện vi khuẩn *A. hydrophila* ở mật độ thấp nhất là 4.5×10^6 CFU/ml trong 100 µl máu cá (giếng 4, Hình 3). Độ nhạy phát hiện *A. hydrophila* của qui trình thấp hơn so thí nghiệm xác định độ nhạy qui trình mPCR phát hiện của Chu *et al.* (2005) (phát hiện ở mức 10^2 CFU/ml). Tuy nhiên, qui trình nhóm tác giả này sử dụng

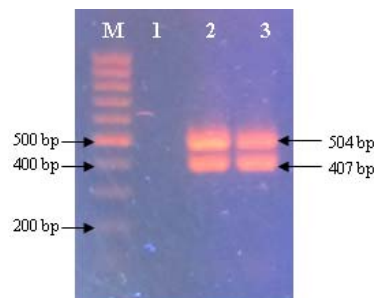
DNA chiết tách từ vi khuẩn. Ngoài ra tác giả sử dụng đoạn mồi khác để khuếch đại đoạn gen đặc hiệu vùng 16S rDNA và gen Aerolysin của *A. hydrophila*. Mặc dù qui trình trong nghiên cứu này chỉ có độ nhạy tương đối thấp nhưng vẫn có ứng dụng tốt để phát hiện *E. ictaluri* và *A. hydrophila* từ máu cá tra.



Hình 3: Sản phẩm mPCR xác định độ nhạy phát hiện *E. ictaluri* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và vi khuẩn. Giếng M: thang DNA (Bio-rad); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2-9: DNA chiết tách từ 100µl máu với mật độ cho vi khuẩn *E. ictaluri* lần lượt là $2.25 \times 10^{8-1}$ CFU/ml, mật độ cho vi khuẩn *A. hydrophila* lần lượt là $4.5 \times 10^{8-1}$ CFU/ml

3.2 Qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *F. columnare*

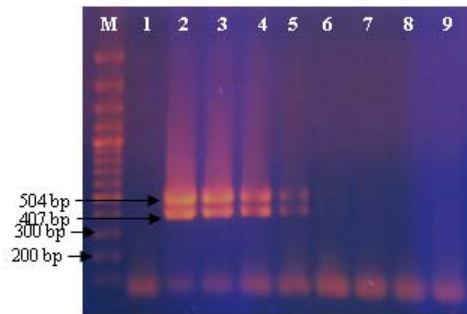
Qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *F. columnare* từ máu cá tra được thực hiện dựa trên hai qui trình PCR đơn mồi phát hiện *E. ictaluri* và *F. columnare* (Đặng Thị Hoàng Oanh và Đặng Thụy Mai Thy, 2009; Nguyễn Hà Giang và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2010) gồm 1X dung dịch đệm; 1.5mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 0.5 U Taq DNA polymerase; 0.4 µM mồi xuôi (EiFd-1); 0.4 µM mồi ngược (EiRs); 0.6 µM mồi xuôi (FcFd); 0.6 µM mồi ngược (FcRs) và 500ng mẫu DNA vi khuẩn được chiết tách từ máu cá. Chu kì nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 4 phút; sau đó 95°C trong 30 giây; 58°C trong 45 giây; 72°C trong 30 giây; lặp lại chu kì trên 30 lần; 72°C trong 10 phút.



Hình 4: Sản phẩm mPCR phát hiện *E. ictaluri* và *F. columnare* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); Giếng 1: đối chứng âm (nước); giếng 2: đối chứng dương (vi khuẩn); giếng 3: DNA vi khuẩn *E. ictaluri* và *F. columnare* chiết tách từ máu cá tra (tỉ lệ 1:1)

Kết quả điện di sản phẩm mPCR mẫu DNA chiết tách từ máu cá trộn với vi khuẩn *E. ictaluri* và *F. columnare* với tỉ lệ (1 *E. ictaluri* : 1 *F. columnare*) hiện đồng thời hai vạch, vạch 407 bp là vạch đặc hiệu của *E. ictaluri* và vạch 504 bp đặc hiệu của *F. Columnare* (Giếng 3, Hình 4) và không phát hiện sản phẩm không đặc hiệu. Kết quả điện di sản phẩm qui trình mPCR cho thấy qui trình có thể phát hiện được cả hai loại vi khuẩn ở với mật độ thấp nhất là $2,25 \times 10^4$ CFU/ml (giếng 6, Hình 5).

Qui trình có độ nhạy cao hơn nghiên cứu gần đây của Welker (2005), phát hiện *F. columnare* từ máu với mật độ vi khuẩn thấp nhất là 40 CFU/mg (tương đương 4×10^4 CFU/ml). Bên cạnh đó tác giả sử dụng qui trình PCR đơn để phát hiện *F. Columnare*. Qui trình của chúng tôi với độ nhạy cao có ứng dụng tốt để phát hiện đồng thời *E. ictaluri* và *F. columnare* nhiễm trong máu cá tra.

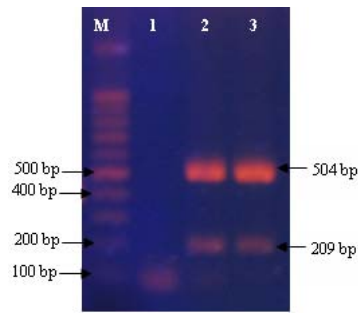


Hình 5: Sản phẩm PCR xác định độ nhạy của qui trình mPCR phát hiện *E. ictaluri* và *F. columnare* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Bio-rad); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2-9: DNA chiết tách từ 100µl máu với mật độ cho mỗi loại vi khuẩn (*E. ictaluri* và *F. columnare*) lần lượt là $2.25 \times 10^{8-1}$ CFU/ml

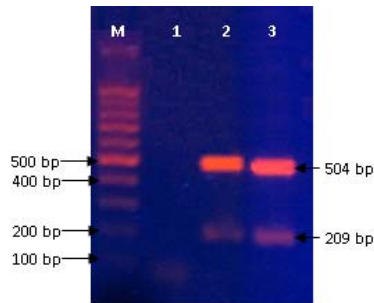
3.3 Qui trình mPCR phát hiện đồng thời *F. columnare* và *A. hydrophila*

Qui trình mPCR phát hiện đồng thời *F. columnare* và *A. hydrophila* từ máu cá tra được thực hiện dựa trên hai qui trình PCR đơn mỗi phát hiện *F. columnare* và *A. hydrophila* (Nguyễn Hà Giang và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2010; Nguyễn Hà Giang *et al.*, 2010) gồm 1X dung dịch đệm; 1.5mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 0.5 U Taq DNA polymerase; 0.5 µM mỗi xuôi (AeroFd); 0.5 µM mỗi ngược (AeroRs); 0.6 µM mỗi xuôi (FcFd); 0.6 µM mỗi ngược (FcRs) và 500ng mẫu DNA vi khuẩn được chiết tách từ máu cá. Chu kì nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 4 phút; sau đó 95°C trong 30 giây; 58°C trong 45 giây; 72°C trong 30 giây; lặp lại chu kì trên 30 lần; 72°C trong 10 phút.

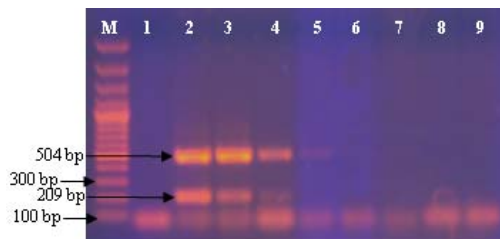
Kết quả điện di sản phẩm mPCR mẫu DNA chiết tách từ máu cá trộn với vi khuẩn *F. columnare* và *A. hydrophila* (với tỉ lệ 1 *F. columnare* : 1 *A. hydrophila*) hiện đồng thời vạch 504 bp đặc hiệu với *F. columnare* và vạch 209 bp đặc hiệu với *A. hydrophila* (giếng 3, hình 6) cho thấy qui trình hiện vạch đặc hiệu của *A. hydrophila* mờ hơn hiện vạch đặc hiệu của *F. columnare*. Qui trình được điều chỉnh với hàm lượng DNA khuôn của *A. hydrophila* trong mẫu chiết tách tăng bằng cách trộn 100µl máu với vi khuẩn *A. hydrophila* và *F. columnare ophila* theo tỉ lệ: 1 *F. columnare*: 2 *A. hydrophila*. Kết quả điện di sản phẩm PCR của qui trình mPCR phát hiện đồng thời *F. columnare* và *A. hydrophila* sau khi điều chỉnh cho kết quả hiện vạch *A. hydrophila* rõ hơn và không phát hiện sản phẩm không đặc hiệu (giếng 3, Hình 7). Điều này chứng tỏ với nhiệt độ gắn mỗi là 58°C thì qui trình ưu tiên khuếch đại đoạn gen đặc hiệu của *F. columnare*.



Hình 6: Sản phẩm mPCR phát hiện *F. columnare* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá với vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2: đối chứng dương (vi khuẩn); Giếng 3: DNA vi khuẩn *F. columnare* và *A. hydrophila* được chiết tách từ máu cá tra (tỉ lệ 1:1)



Hình 7: Sản phẩm mPCR phát hiện *F. columnare* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá với vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2: đối chứng dương (vi khuẩn); Giếng 3: DNA vi khuẩn *F. columnare* và *A. hydrophila* chiết tách từ máu cá tra (tỉ lệ 1: 2)

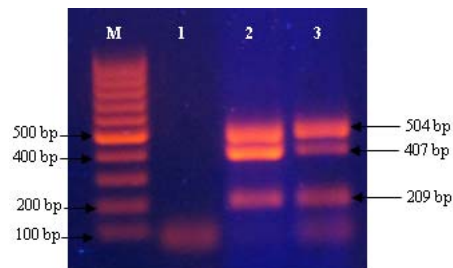


Hình 8: Sản phẩm mPCR xác định độ nhạy phát hiện *F. columnare* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và vi khuẩn (tỉ lệ 1 *F. columnare* : 2 *A. hydrophila*). Giếng M: thang DNA 100 bp (Bio-rad); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2-9: DNA chiết tách từ 100µl máu với mật độ vi khuẩn *F. columnare* lần lượt là $2.25 \times 10^{8-1}$ CFU/ml, *A. hydrophila* lần lượt là $4.5 \times 10^{8-1}$ CFU/ml

Độ nhạy của qui trình mPCR phát hiện *F. columnare* và *A. hydrophila* cho thấy qui trình có thể phát hiện *F. columnare* ở với mật độ thấp nhất là 2.25×10^5 CFU/ml trong 100 µl máu cá (giếng 5, Hình 8), *A. hydrophila* với mật độ thấp nhất là 4.5×10^6 CFU/ml trong 100 µl máu cá (giếng 4, Hình 8). So với qui trình mPCR phát hiện *E. ictaluri* và *A. hydrophila* thì cả hai qui trình đều cho kết quả phát hiện *A. hydrophila* ở mật độ thấp nhất là 4.5×10^6 CFU/ml.

3.4 Qui trình mPCR phát hiện *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare*

Qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* từ máu cá tra được thực hiện trên cơ sở của các qui trình mPCR phát hiện đồng thời hai vi khuẩn ở trên. Thành phần phản ứng gồm: 1X dung dịch đệm; 1.5mM MgCl₂; 200 μM dNTPs; 0.5 U Taq DNA polymerase; 0.4 μM mỗi xuôi (EiFd-1); 0.4 μM mỗi ngược (EiRs); 0.5 μM mỗi xuôi (AeroFd); 0.5 μM mỗi ngược (AeroRs); 0.6 μM mỗi xuôi (FcFd); 0.6 μM mỗi ngược (FcRs) và 500ng mẫu DNA vi khuẩn được chiết tách từ máu cá. Chu kỳ nhiệt thực hiện phản ứng là 95°C trong 4 phút; sau đó 95°C trong 30 giây; 58°C trong 45 giây; 72°C trong 30 giây; lặp lại chu kỳ trên 30 lần; 72°C trong 10 phút. Mẫu DNA: trộn 100 μl máu cá tra với 500 μl vi khuẩn (với tỉ lệ 1 *E. ictaluri* : 2 *A. hydrophila* : 1 *F. columnare*). Kết quả điện di sản phẩm PCR hiện đồng thời 3 vạch đặc hiệu của *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* 504 bp, 407 bp và 209 bp (giếng 2, Hình 9).

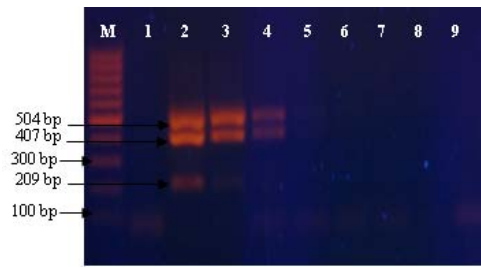


Hình 9: Sản phẩm qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 3: đối chứng dương (vi khuẩn); Giếng 2: DNA vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* được chiết tách từ máu cá tra (với tỉ lệ 1:2:1)

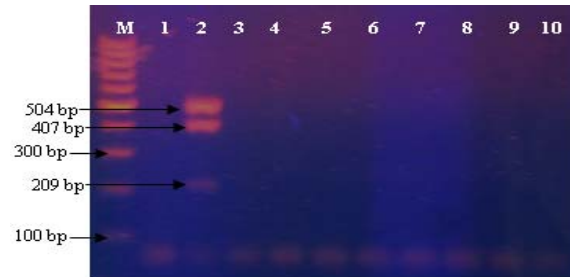
Qui trình cho kết quả phát hiện *E. ictaluri* và *F. columnare* với mật độ thấp nhất là 1.5×10^5 CFU/ml (giếng 5, Hình 10), *A. hydrophila* với mật độ thấp nhất là 3×10^6 CFU/ml (giếng 4, hình 10). Theo Panangala *et al.* (2007) thì qui trình mPCR phát hiện có độ nhạy phát hiện *A. hydrophila* thấp hơn độ nhạy phát hiện *E. ictaluri* và *F. columnare*. Bên cạnh, ưu điểm hiện đồng thời ba loài vi khuẩn khi thực hiện 1 phản ứng, thì qui trình còn tiết kiệm được chi phí so với các qui trình đơn (hàm lượng Taq DNA polymerase không đổi 0.5 U). Kết quả xác định tính đặc hiệu của qui trình mPCR cho kết quả hiện vạch ở vị trí 504 bp, 407 bp và 209 bp (giếng 2, Hình 11). Tất cả các mẫu còn lại (giếng 3-11) đều không hiện vạch. Kết quả này tương tự như báo cáo của Panangala *et al.* (2007) và Nguyễn Hà Giang (2010).

3.5 Ứng dụng qui trình mPCR phát hiện đồng thời *F. columnare*, *E. ictaluri* và *A. hydrophila* sử dụng DNA chiết tách từ máu cá tra

Mẫu sử dụng (mẫu M1, M2 và M3) để thử nghiệm khả năng ứng dụng của của qui trình là mẫu được thu từ thí nghiệm gây cảm nhiễm được tiêm ba loài vi khuẩn. Kết quả điện di sản phẩm mPCR phát hiện đồng thời hai vi khuẩn (Hình 12) và phát hiện đồng thời ba (Hình 13) cho thấy mẫu M1 và M2 cho kết quả dương tính cùng lúc ba loài vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare*, mẫu M3 chỉ dương tính với vi khuẩn *E. ictaluri*, kết quả này cho kết quả đúng ở cả 4 qui trình. Vậy các qui trình mPCR có khả năng ứng dụng tốt trong việc phát hiện cùng lúc các loài vi khuẩn *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* từ máu cá tra.



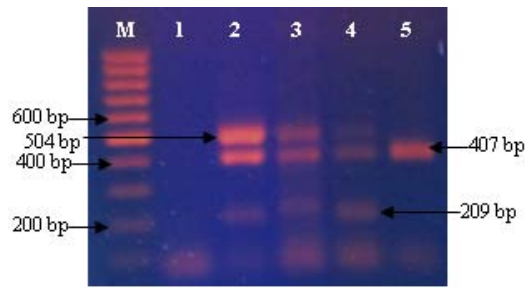
Hình 10: Sản phẩm mPCR xác định độ nhạy phát hiện *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2-9: DNA chiết tách từ 100µl máu với mật độ cho mỗi loại vi khuẩn (*E. ictaluri* và *F. columnare*) lần lượt là $1.5 \times 10^{8-1}$ CFU/ml, với vi khuẩn *A. hydrophila* lần lượt là $3 \times 10^{8-1}$ CFU/ml



Hình 11: Sản phẩm mPCR xác định tính đặc hiệu phát hiện đồng thời *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* sử dụng DNA chiết tách từ hỗn hợp máu cá và 3 vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); Giếng 1: đối chứng âm; giếng 2: đối chứng dương; Giếng 3: *Bacillus subtilis*; Giếng 4: *V. anguillarum* LMG 4437; Giếng 5: *V. alginolyticus* LMG 4409; Giếng 6: *Escherichia coli* LMG 8223; Giếng 7: *V. harveyi*; Giếng 8: *A. carvia* C-V-TN-A-4-O-1; Giếng 9: *Pseudomonas putida* C-V-VL-A-3-S-4; Giếng 10: *Aeromonas sp.* C-V-VL-A-4-O-1



Hình 12: Sản phẩm mPCR ứng dụng phát hiện đồng thời 2 vi khuẩn từ máu cá tra. Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2: đối chứng dương (*E. ictaluri* và *F. columnare*); Giếng 3: đối chứng dương (*E. ictaluri* và *A. hydrophila*); Giếng 4: đối chứng dương (*F. columnare* và *A. hydrophila*); Giếng 5,6,7: mẫu M1,M2,M3 phát hiện *E. ictaluri* và *F. columnare*; Giếng 8,9,10: mẫu M1,M2,M3 (mPCR *F. columnare* và *A. hydrophila*); Giếng 11,12,13: mẫu M1,M2,M3 (mPCR *F. columnare* và *A. hydrophila*)



Hình 13: Sản phẩm mPCR ứng dụng để phát hiện đồng thời 3 vi khuẩn. Giếng M: thang DNA 100 bp (Fermentas); Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2: đối chứng dương (*E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare*); Giếng 3,4,5: mẫu M1, M2, M3

4 KẾT LUẬN

Qui trình mPCR phát hiện đồng thời *E. ictaluri*, *A. hydrophila* và *F. columnare* sử dụng DNA chiết tách từ máu cá tra với thời gian chẩn đoán ngắn, chi phí thấp, độ nhạy của qui trình cao, đặc hiệu và không gây chết cá có thể ứng dụng để xét nghiệm/chẩn đoán bệnh vi khuẩn trên cá tra, đặc biệt là cá bố mẹ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bilodeau, A. L., G. C. Waldbieser, J. S. Terhune, D. J. Wise and W. R. Wolters. (2003). A real time polymerase chain reaction assay of the bacterium *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*. 15: 80-86.
- Chu, W.H., C.P. Lu. (2005). Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*, 28, 437-441.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Đặng Thụy Mai Thy. (2009). Nghiên cứu ứng dụng qui trình PCR chẩn đoán vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* trên thân cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Kỷ yếu hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc*.
- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương. (2009). Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh mù gan trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng phương pháp PCR. *Tạp chí khoa học. Đại học Cần Thơ*.
- Nguyễn Hà Giang, Trương Quỳnh Như, Lê Hữu Thôi và Đặng Thị Hoàng Oanh. (2009). Nghiên cứu ứng dụng qui trình PCR chẩn đoán vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* trên thân cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Hội nghị nuôi trồng thủy sản toàn quốc. Đại học Nông lâm, Thành phố Hồ Chí Minh*.
- Nguyễn Hà Giang, Trần Việt Tiên và Đặng Thị Hoàng Oanh. (2010). Nghiên cứu ứng dụng qui trình mPCR phát hiện đồng thời ba loài vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila* và *Flavobacterium columnare*. *Tạp chí khoa học. Đại học Cần Thơ*.
- Panangala, V. S., Craig A. Shoemaker, Vicky L. Van Santen, Kevin Dybvig, Phillip H. Klesius. (2007). Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacteria fish pathogen, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*. *Disease of aquatic organisms* 74: 199-208.
- Taggart, J. B., R. A. Hynes, P. A. Podohl and A. Ferguson. (1992). A simplified protocol for routine total DNA isolate from salmonid fishes. *Journal of fish Biology* 40: 963-965.
- Welker, TL., CA. Shoemaker, CR. Arias, PH. Klesius. (2005). Transmission and detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Dis Aquat Org* 63: 129-138.