

APPLICATION OF MULTIPLEX-PCR TO DETERMINE SEROTYPE AND VIRULENCE GENES OF *Streptococcus agalactiae* CAUSING DISEASE IN NILE TILAPIA

Pham Hong Nhat^{1*}, Vu Thi Huyen¹, Vu Thi Trang¹, Ngo Phu Thoa^{2,3}

Pham Thu Uyen², Nguyen Thi Nhien², Pham Anh Tuan⁴, Phan Thi Van¹

¹Research Institute for Aquaculture No.1 (RIA1), ²Vietnam National University of Agriculture (VNUA),

³Mavin Group, ⁴Vietnam Fisheries Society (VINAFIS)

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 25/5/2022	Because of its superiority, multiplex-PCR is frequently used in molecular characterization to identify several target genes in the same reaction, conserving time, chemicals, effort, and achieving high efficiency. In this study, we used multiplex-PCR to detect the serotype and virulence genes of <i>S. agalactiae</i> that cause disease in Nile tilapia. The My Taq TM HS Mix 2 kit was utilized to optimize the multiplex-PCR reaction, which used 2-step thermal cycling. <i>S. agalactiae</i> that causes disease in Nile tilapia in Vietnam has serotypes Ia and III, which comprise 11-13 virulence genes from three main virulence groups (adhesion, invasion, and immune evasion). It proves that all of the strains are virulent. This result will be used to determine the virulence of <i>S. agalactiae</i> in order to develop molecular markers (microsatellites and SNPs) for selective breeding of disease-resistant Nile tilapia in Vietnam.
Revised: 20/7/2022	
Published: 20/7/2022	
KEYWORDS	
Multiplex-PCR	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	
Serotype Ia	
Serotype III	
Virulence genes	

ỨNG DỤNG PHẢN ỨNG MULTIPLEX-PCR ĐỂ XÁC ĐỊNH KIỂU HUYẾT THANH VÀ GEN ĐỘC LỰC CỦA VI KHUẨN *Streptococcus agalactiae* GÂY BỆNH TRÊN CÁ RÔ VẪN

Phạm Hồng Nhật^{1*}, Vũ Thị Huyền¹, Vũ Thị Trang¹, Ngô Phú Thoa^{2,3}

Phạm Thu Uyên², Nguyễn Thị Nhiễm², Phạm Anh Tuấn⁴, Phan Thị Vân¹

¹Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản I, ²Học Viện Nông nghiệp Việt Nam

³Tập đoàn Mavin, ⁴Hội Nghề cá Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 25/5/2022	Phản ứng multiplex-PCR đang được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu phân tử bởi tính ưu việt của nó. Phản ứng multiplex-PCR có thể xác định đồng thời nhiều gen mục tiêu của các mầm trong cùng một phản ứng, giúp tiết kiệm thời gian, hóa chất, công sức và đặc biệt có hiệu quả cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng phản ứng multiplex-PCR để phát hiện kiểu huyết thanh và gen độc lực của vi khuẩn <i>Streptococcus agalactiae</i> gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi vằn (<i>Oreochromis niloticus</i>). Phản ứng multiplex-PCR được tối ưu dựa trên kit My Taq TM HS Mix 2× và sử dụng chu trình nhiệt 2 bước. Kết quả đã xác định được vi khuẩn <i>S. agalactiae</i> gây bệnh trên cá rô phi vằn ở Việt Nam mang kiểu huyết thanh Ia và III, chứa 11-13 gen độc lực thuộc 3 nhóm yếu độc lực chính giúp phát động quá trình gây bệnh của vi khuẩn (yếu tố bám dính, yếu tố xâm nhập và yếu tố kháng miễn dịch). Điều này chứng tỏ các chủng nghiên cứu đều mang độc lực. Kết quả này cũng sẽ được ứng dụng để xác định độc lực của vi khuẩn <i>S. agalactiae</i> phục vụ phát triển chỉ thị phân tử (microsatellite và SNPs) trong chọn giống cá rô phi vằn kháng bệnh xuất huyết.
Ngày hoàn thiện: 20/7/2022	
Ngày đăng: 20/7/2022	
TỪ KHÓA	
Multiplex-PCR	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	
Kiểu huyết thanh Ia	
Kiểu huyết thanh III	
Gen độc lực	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6044>

* Corresponding author. Email: hongnhat@ria1.org

1. Mở đầu

Cá rô phi là một trong những đối tượng nuôi nước ngọt quan trọng ở Việt Nam nói riêng và trên thế giới nói chung. Cá rô phi phổ biến trên 145 quốc gia, trong đó cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) chiếm trên 75% tổng sản lượng cá rô phi trên thế giới [1], [2]. Tuy nhiên, những năm gần đây, dịch bệnh trên cá rô phi đã gây thiệt hại lớn cho người nuôi. Trong đó, bệnh xuất huyết do vi khuẩn nhóm liên cầu khuẩn (*Streptococcus*) là phổ biến và gây thiệt hại nghiêm trọng nhất cho nghề nuôi cá rô phi trên toàn thế giới [3], [4]. Ở Việt Nam, bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* được báo cáo lần đầu tiên năm 2009, gây chết hàng loạt cá rô phi nuôi thương phẩm (86-100%) ở một số vùng nuôi cá rô phi trọng điểm miền Bắc, và xuất hiện hàng năm, từ tháng 5 đến tháng 9, khi nhiệt độ cao và chất lượng nước ao nuôi kém [5].

Vi khuẩn *S. agalactiae* có những cơ chế độc lực khác nhau để phát động quá trình nhiễm trùng và gây bệnh trên cá. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng việc xác định các yếu tố độc lực và định loại kiểu huyết thanh, giúp dự đoán được mức độ độc lực, khả năng gây bệnh của một chủng vi khuẩn nhất định trong tương lai [6]-[8]. Ở vi khuẩn *S. agalactiae*, có 7-14 gen chính đã được xác định có vai trò quyết định độc lực của vi khuẩn, chịu trách nhiệm cho sự xâm nhập, lan truyền thành công và trốn tránh sự phòng thủ miễn dịch của vật chủ, bao gồm: Yếu tố bám dính (fbsA, fbsB, pavA, lmb và scpB), yếu tố xâm lấn (cylE, cfb, spb1, hylB, rib và bca) và yếu tố né tránh miễn dịch (bac, scpB, cspA, Pl-2b và pbp1A/ponA) [9], [10].

Bên cạnh đó, vi khuẩn *S. agalactiae* có các kiểu huyết thanh/ kiểu hình (Serotype) khác nhau dựa vào các kháng nguyên bề mặt vỏ capsular. Vi khuẩn *S. agalactiae* có 10 kiểu huyết thanh khác nhau (Ia, Ib và II đến IX), trong đó 5 kiểu huyết thanh Ia, Ib, III, IV và IX là kiểu huyết thanh chính gây bệnh trên cá rô phi [7], [8], [11]-[17]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh mối tương quan giữa nhóm gen độc lực chính của vi khuẩn *S. agalactiae* với kiểu huyết thanh và kết quả lây nhiễm thực nghiệm [7], [8]. Trong đó, các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* có huyết thanh Ia là nguyên nhân chính gây ra bệnh xuất huyết cho cá rô phi [7], [8], [15].

PCR đa môi (Multiplex-PCR) là một kỹ thuật sinh học phân tử phổ biến để khuếch đại nhiều trình tự mục tiêu với sự tham gia của nhiều cặp môi trong một phản ứng PCR duy nhất. Multiplex-PCR là kỹ thuật để phát hiện sự mất đoạn trong gen dystrophin (liên quan đến sự loạn dưỡng cơ), được mô tả lần đầu tiên vào năm 1988 [18]. Ưu điểm chính của kỹ thuật này là tiết kiệm thời gian, hóa chất, chi phí, công sức, lượng mẫu đầu vào, và hạn chế âm tính/dương tính giả; nhưng có hạn chế là việc thiết kế môi cho một số gen mục tiêu ghép Multiplex phức tạp hơn (các môi phải có nhiệt độ nóng chảy tương tự nhau, không có sự bắt cặp - Dimer), sự ức chế hoạt động lẫn nhau của các môi, độ nhạy thường kém hơn phản ứng PCR đơn môi [19]. Những hạn chế của phản ứng multiplex-PCR có thể khắc phục dựa trên công cụ sinh học phân tử hiện đại, do đó kỹ thuật này đã và đang được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu phát hiện mầm bệnh, xác định kiểu gen SNP, phát hiện sinh vật biến đổi gen, phân tích đột biến, đa hình, xóa gen, định lượng mẫu [20]-[23].

Chính vì thế, chúng tôi thực hiện nghiên cứu "Ứng dụng phản ứng multiplex-PCR xác định kiểu huyết thanh và gen độc lực của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi vằn" để phát hiện vi khuẩn chứa độc lực cao, là nguồn vật liệu cho phát triển chỉ thị phân tử liên kết khả năng kháng bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi vằn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Ba chủng vi khuẩn *S. agalactiae* 013-RIA1; 015-RIA1 và 023-RIA1 phân lập từ cá rô phi vằn nhiễm bệnh xuất huyết trong vùng nuôi cá rô phi nước ngọt và lợ mặn tại các tỉnh Hà Tĩnh, Bắc Ninh và Yên Bái. Các chủng vi khuẩn này hiện đang lưu giữ tại Trung tâm Quan trắc môi trường và bệnh thủy sản miền Bắc (CEDMA), Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản I (RIA1).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị vi khuẩn *S. agalactiae*

Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường canh từ não và tim (Brain heart infusion broth - BHIB, Merck) trong 24 giờ ở 30°C. Thành phần môi trường canh BHI gồm: 5 g/L tim bò; 12,5 g/L não bê; 2,5 g/L NaH₂PO₄; 2 g/L D(+)-glucose; 10 g/L peptone và 5 g/L NaCl. Sau đó, ly tâm dịch nuôi cấy ở 7.000 vòng/phút trong 5 phút. Thu dịch lọc vi khuẩn ở mật độ 10⁹ cfu/ml bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 590 nm kết hợp với phương pháp đếm số khuẩn lạc trên môi trường chọn lọc Chromagar Strep B (Melab, Việt Nam).

Tách chiết DNA của vi khuẩn *S. agalactiae*

DNA của vi khuẩn *S. agalactiae* được tách chiết theo kit Exgene tissue SV (GeneAll, Hàn Quốc). Quy trình tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm DNA của vi khuẩn được kiểm định chất lượng bằng phản ứng PCR khuếch đại vùng gen 16S rRNA của vi khuẩn *S. agalactiae* sử dụng cặp mồi Universal primers 8F (5'-GTTTACCTTGTTACGACTT-3') và 1492R (5'-AGAGTTTGATCCTGGATGCTCAG-3') theo Laith và cộng sự (2017) [24]. Đối chứng dương là chủng chuẩn ATCC-13813 (NR040821.1), Nhật Bản.

Thành phần phản ứng PCR được thiết lập dựa trên kit My Taq Mix 2× (Meridian Bioscience, Đức); với thể tích 25μl gồm 12,5μl MyTaq Mix 2×; 1μl mồi 10μM mỗi loại; 1μl DNA khuôn và H₂O đề ion. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR như sau: 95°C trong 3 phút; sau đó là 35 chu kỳ (95°C trong 60 giây, 55°C trong 60 giây, 72°C trong 2 phút); cuối cùng ở 72°C trong 3 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di gel agarose 1,5% với thang DNA chuẩn 50bp (Hyper Ladder™ 50 bp - Bionline, Mỹ).

Sản phẩm PCR gen 16S rRNA được tinh sạch bằng kit QIAquick PCR purification (Qiagen, Đức), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm tinh sạch được giải trình tự trên hệ thống ABI PRISM 3500 (First Base, Malaysia). Trình tự gen được đánh giá tín hiệu các nucleotide, được chỉnh sửa, loại bỏ tín hiệu nhiễu bằng phần mềm Finch TV 1.4.0 và BioEdit 7.0.5. Trình tự gen 16S rRNA hoàn chỉnh của vi khuẩn sẽ được công bố trên GenBank (NCBI) và so sánh mức độ tương đồng (Percentage of Identities) với các trình tự gen 16S rRNA khác đã công bố sử dụng công cụ BLAST trên NCBI.

Tối ưu phản ứng Multiplex-PCR xác định kiểu huyết thanh của vi khuẩn *S. agalactiae*

Năm kiểu huyết thanh của vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh phổ biến trên cá rô phi đã được xác định sử dụng phản ứng multiplex-PCR với 6 cặp mồi đặc hiệu khuếch đại 4 gen *cps* (*cpsL*, *cpsG*, *cpsJ*, *cpsI*) và chu trình nhiệt như nghiên cứu của Imperi và cộng sự (2010) [25], với một số thay đổi trong thành phần phản ứng. Phản ứng Multiplex-PCR xác định kiểu huyết thanh của vi khuẩn được tối ưu theo kit My Taq™ HS Mix 2× (Meridian Bioscience, Đức). Thành phần phản ứng multiplex-PCR trong thể tích 50μl gồm: 25μl MyTaq HS Mix 2×; 1μl mồi xuôi và mồi ngược mỗi loại (nồng độ mồi 10μM), 5μl DNA vi khuẩn (~100 ng) và nước đề ion. Chu trình nhiệt được thực hiện như phụ lục 1 kèm theo. Sản phẩm multiplex-PCR được điện di trên gel agarose 2%. Kết quả được xác định bằng sự hiện diện của nhiều băng trên cùng một sản phẩm PCR.

Tối ưu phản ứng Multiplex-PCR xác định 14 gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae*

Hỗn hợp các cặp mồi (Multiplex) của 14 gen độc lực được thiết kế bằng phần mềm Multiplex Manager software [26] dựa trên nhiệt độ gắn mồi của từng cặp mồi. Việc bắt chéo giữa các cặp mồi được kiểm tra online bằng Multiple Primer Analyzer (Thermo Scientific, UK). Trình tự mồi mới của gen *sbp1* (mã số trên GenBank là AF485279.1) với kích thước 666 bp đã được thiết kế online bằng công cụ Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Thông tin chi tiết 3 tổ hợp Multiplex của 14 gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* được trình bày ở bảng 1.

Thành phần phản ứng Multiplex-PCR xác định gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* tương tự như trong phản ứng Multiplex-PCR xác định kiểu huyết thanh. Chu trình nhiệt hai bước với nhiệt độ gắn mồi 55°C và 60°C được thực hiện như sau: Giai đoạn tiền biến tính ở 95°C trong 5 phút; tiếp đó là 25 chu kỳ lần 1 (biến tính ở 95°C trong 60 giây, gắn mồi ở 55°C trong 60 giây,

tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 2 phút); 25 chu kỳ lần 2 (biến tính ở 95°C trong 60 giây, gắn môi ở 60°C trong 60 giây, tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 2 phút); hoàn thành ở 72°C trong 10 phút và giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra tương tự như nội dung trên.

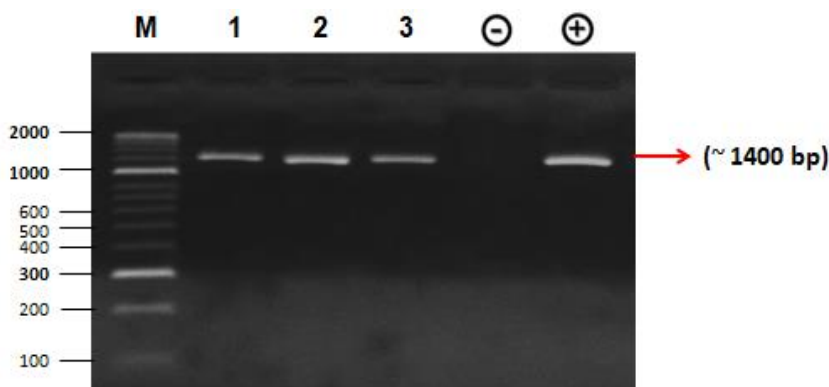
Bảng 1. Thông tin môi sử dụng xác định 14 gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae*

Nhân tố độc lực của vi khuẩn	Trình tự môi (5'-3')	Nhiệt độ gắn môi (°C)	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Vai trò
Multiplex I:				
Fibrinogen-binding protein B/ fbsB	F: CACTCGATAACACTGTGGAT R: CTGGAACGTTTCTGTCTTG	55,15	936	Bám dính
C-β protein/ bac	F: CTCCAAGCTCTCACTCATAG R: GAAACATCTGCCACTGATAC	55,07	750	Kháng miễn dịch
CAMP factor/ cfb	F: GGATTCAACTGAACTCCAAC R: GACAACCTCCACAAGTGGTAA	55,22	600	Xâm nhập
β-hemolysin/ cytolysin/ cyle	F: GTACATTAGGTGCCTTTGG R: TACTCAGCCTTTCTCCATC	54,12	564	Xâm nhập
Fibrinogen-binding protein A/ fbsA	F: AACCGCAGCGACTTGTTA R: AAACAAGAGCCAAGTAGGTC	56,19	278	Bám dính
Multiplex II:				
Penicillin-binding protein1A/ pbp1A/ponA	F: AGGGGTAGTAGCATTACCAT R: CAACTATATGACTGGGATCG	53,71	939	Kháng miễn dịch
Fibronectin-binding protein/ pavA	F: TACTACCAAGAGAAGGCTGA R: GGAGAGACGAGCTTTAGAGT	53,94	729	Bám dính
C-α protein/ bca	F: TAACAGTTATGATACTTCACAGAC R: ACGACTTTCTTCCGTCCTTAGG	54,17	535	Xâm nhập
Hyaluronate lyase/ hylB	F: TCTATGCTGACGGTTCTTAC R: GAGGTCTAAGTTTCGCTCTT	54,53	323	Xâm nhập
Laminin-binding protein/ lmb	F: TCAGTTAGTTGCTCTGCTTC R: CTTTATGACCCACATACCTG	54,19	152	Bám dính
Multiplex III:				
Serine protease/ cspA	F: CTGCTAAAGCACACCTAAAC R: ATCAGTAGTGGTTCCTTTCC	55,37	971	Kháng miễn dịch
Hemolysin III/ spb1	F: CTGCTCCAAGCATAATGCTT R: ACCCATCAGAACCAAAAGT	54,99	648	Xâm nhập
Hemolysin III / spb1 modified	F: CAAAAAGGCGCAACCTATAA R: AGTTGCTTTTTCCGAACCTT	58,23	666	Xâm nhập
Surface protein/ rib	F: GGGGTTACACAAGGTAATCT R: TCCACTTAGGATCGTTTG	51,07	425	Xâm nhập
C5a peptidase/ scpB	F: ACAACGGAAGGCGCTACTGTTC R: ACCTGGTGTGACCTGAACCTA	59,17	255	Bám dính

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Tách chiết DNA của vi khuẩn *S. agalactiae*

Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng gen 16S rRNA của 03 mẫu vi khuẩn phân tích cho thấy vạch băng sáng rõ, không bị đứt gãy. Sản phẩm PCR chỉ xuất hiện vạch băng DNA với kích thước khoảng 1.400bp tương ứng với đối chứng dương (chủng chuẩn ATCC-13813), bên cạnh đó mẫu đối chứng âm không xuất hiện vạch băng DNA (Hình 1). Trình tự gen 16S rRNA hoàn chỉnh của vi khuẩn *S. agalactiae* đã được xác định gồm 1.421 nucleotide và được đăng ký trên GenBank với mã số là OK047709.1.

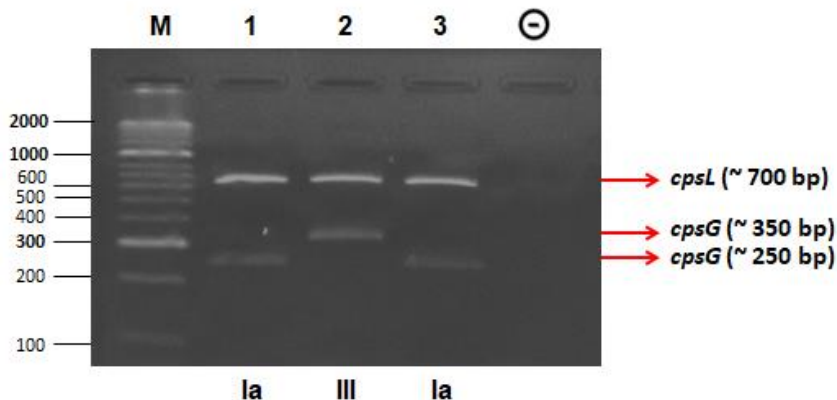


Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng gen 16S rRNA của vi khuẩn *S. agalactiae* trên gel agarose 2%

Giếng 1: Chủng 013-RIA1; Giếng 2: Chủng 023-RIA1; Giếng 3: Chủng 015-RIA1; Giếng (-): Mẫu đối chứng âm; Giếng (+): Mẫu đối chứng dương; M: Ladder 50bp

Kết quả BLAST so sánh mức độ tương đồng của gen 16S rRNA của 3 chủng nghiên cứu với các chủng đã công bố trên GenBank thấy rằng, trình tự 16S rRNA của 3 chủng phân lập được tương đồng $\geq 99,86\%$ với các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập từ cả cá nước ngọt và nước biển, bao gồm: cá chẻm ở Iran (MW680900.1), cá mập ở Israel (MK517599.1); cá chạch (MH423900.1) ở Trung Quốc; chủng chuẩn ATCC.13813 (NR040821.1) và ATCC.700208 (MK330564.1), phụ lục 2 kèm theo. Điều này chứng tỏ DNA của vi khuẩn *S. agalactiae* đã được tách chiết thành công, các kết quả tiếp theo là đáng tin cậy.

3.2. Tối ưu phản ứng Multiplex PCR xác định kiểu huyết thanh của vi khuẩn *S. Agalactiae*



- | |
|--|
| 1. Serotype Ia: <i>cpsL</i> (688) + <i>cpsG</i> (272) |
| 2. Serotype III: <i>cpsL</i> (688) + <i>cpsG</i> (352) |

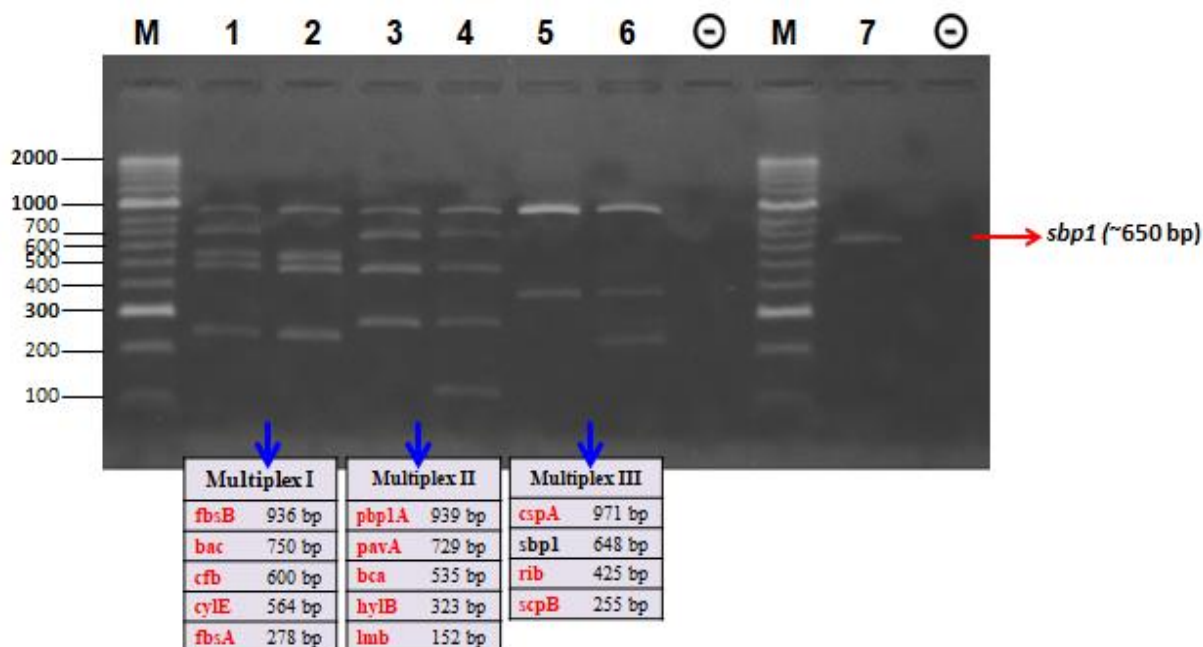
Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm Multiplex-PCR xác định kiểu huyết thanh của vi khuẩn *S. agalactiae*
Giếng 1: Chủng 013-RIA1; Giếng 2: Chủng 023-RIA1; Giếng 3: Chủng 015-RIA1; Giếng (-): Mẫu ĐC âm;
M: Ladder 50bp

Phản ứng multiplex-PCR đã được phát triển để xác định kiểu huyết thanh của vi khuẩn *S. agalactiae* dựa trên sự hiện diện của 3 gen *cps* (*cpsG*, *cpsJ* và *cpsL*). Kết quả điện di sản phẩm Multiplex-PCR xác định kiểu huyết thanh của vi khuẩn *S. agalactiae* xuất hiện 2 vạch băng sáng rõ, không bị đứt gãy (Hình 2). Kết quả cho thấy chủng 015-RIA1 và 013-RIA1 có kiểu huyết thanh Ia, với sự hiện diện của 2 gen *cpsL* (khoảng 700bp) và *cpsG* (khoảng 250bp); chỉ duy nhất chủng 023-RIA1 có kiểu huyết thanh III, với sự hiện diện của 2 gen *cpsL* (khoảng 700bp) và *cpsG* (khoảng 350bp). Kết quả này phù hợp với dữ liệu từ các nước Đông Nam Á xung quanh

(Malaysia, Thái Lan, Philippine) và Trung Quốc, khi tất cả đều báo cáo vi khuẩn *S. agalactiae* mang kiểu huyết thanh Ia là nguyên nhân phổ biến nhất gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi nuôi; ở Trung Quốc là trên 90%; Đài Loan là 100%, Philippine là 83%, Thái Lan là 44% [7], [8], [13], [16], [17].

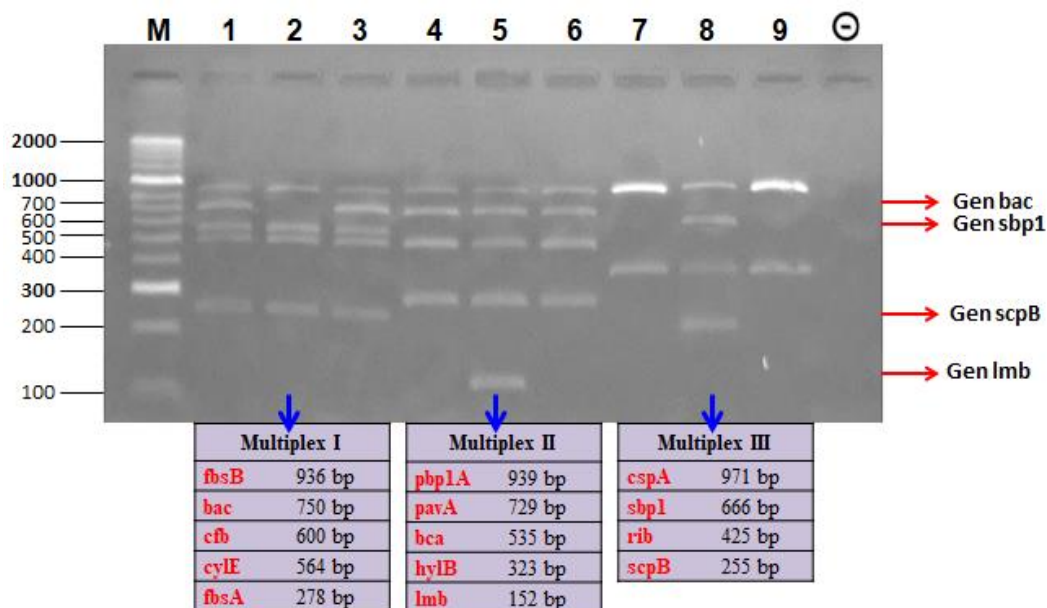
3.3. Tối ưu phản ứng Multiplex-PCR xác định 14 gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae*

Trong quá trình tối ưu phản ứng multiplex-PCR xác định gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae*, chúng tôi đã lựa chọn chu trình nhiệt hai bước. Trong đó, nhiệt độ gắn mỗi trong chu trình nhiệt bước 1 và bước 2 lần lượt là 55°C và 60°C, dựa vào nhiệt độ gắn mỗi giữa các tổ hợp mỗi trong từng Multiplex; và lựa chọn 25 chu kỳ cho mỗi chu trình nhiệt. Kết quả cho thấy, 13/14 gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* đã được tối ưu thành công, trừ duy nhất gen *sbp1* thuộc multiplex III. Sau đó, phản ứng PCR khuếch đại gen *sbp1* đã được thực hiện độc lập. Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *sbp1* cho băng sáng rõ và kích thước khoảng 650bp tương ứng với kích thước dự kiến (hình 3). Như đã đề cập ở trên, nhược điểm của phản ứng Multiplex-PCR thường xảy ra hiện tượng ức chế hoạt động lẫn nhau của các cặp mồi, đó có thể là nguyên nhân dẫn đến hiện tượng không xuất hiện gen *sbp1* trong phản ứng Multiplex III nêu trên.



Hình 3. Hình ảnh điện di sản phẩm Multiplex-PCR xác định gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* Giếng 1,3,5: Chủng 015-RIA1 (serotype Ia); Giếng 2,4,6: Chủng 023-RIA1 (serotype III); Giếng 7: Sản phẩm PCR gen *sbp1* của chủng 023-RIA1; M: Ladder 500bp

Sau đó, mồi mới đã được thiết kế dựa trên trình tự gen *sbp1* trên GenBank có mã số AF485279.1 với kích thước 666 bp. Phản ứng multiplex-PCR đã được phát triển để xác định 14 gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae*, tùy thuộc vào kiểu huyết thanh khác nhau. Vi khuẩn mang kiểu huyết thanh Ia chứa 11 gen độc lực, thiếu gen *lmb* (khoảng 150 bp) ở nhóm Multiplex II; thiếu gen *sbp1* (khoảng 650 bp) và gen *scpB* (khoảng 250 bp) ở nhóm Multiplex III. Vi khuẩn mang kiểu huyết thanh III chứa 13 gen độc lực, thiếu duy nhất gen *bac* (750 bp) ở nhóm Multiplex I (Hình 4). Kết quả này của chúng tôi tương ứng với kết quả nghiên cứu gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae* ở Thái Lan [7], Philippine [8]. Các nghiên cứu này xác định rằng vi khuẩn *S. agalactiae* đều chứa 11-13 gen độc lực, số lượng tùy thuộc vào kiểu huyết thanh của vi khuẩn.



Hình 4. Hình ảnh điện di sản phẩm Multiplex-PCR xác định gen độc lực của vi khuẩn *S. agalactiae*
 Giếng 1,4,7: Chủng 013-RIA1; Giếng 2,5,8: Chủng 023-RIA1; Giếng 3,6,9: Chủng 015-RIA1;
 Giếng (-): Mẫu ĐC âm; M: Ladder 50bp

Tuy nhiên, kết quả tối ưu phản ứng Multiplex-PCR trong nghiên cứu này có tính khác biệt so với nghiên cứu trước đó của Kannika và cộng sự (2017) [7]. Về số lượng phản ứng PCR/Multiplex-PCR, nghiên cứu trước đây sử dụng 4 phản ứng (3 phản ứng Multiplex khuếch đại 13 gen độc lực và 1 phản ứng PCR đơn mỗi với gen *sbp1*), trong khi nghiên cứu của chúng tôi chỉ sử dụng 3 phản ứng Multiplex khuếch đại 14 gen độc lực. Số lần thực hiện phản ứng PCR/Multiplex-PCR, nghiên cứu trước đây phải thực hiện 4 phản ứng PCR/Multiplex-PCR với 4 lần chạy khác nhau do chu trình nhiệt giữa các phản ứng PCR/Multiplex-PCR là khác nhau; ngược lại nghiên cứu của chúng tôi chỉ thực hiện duy nhất 1 phản ứng Multiplex-PCR đã xác định được tất cả 14 gen độc lực, do chỉ sử dụng duy nhất 1 chu trình nhiệt. Như vậy, có thể thấy phản ứng Multiplex-PCR trong nghiên cứu này tối ưu hơn, giúp tiết kiệm thời gian, chi phí và công sức trong nghiên cứu. Sở dĩ có sự khác biệt như vậy có thể do chúng tôi đã: (1) Sử dụng phần mềm để xác định các Multiplex dựa vào nhiệt độ gắn mỗi của từng cặp mỗi cũng như kiểm tra việc bắt chéo giữa các cặp mỗi, vì vậy giữa các cặp mỗi trong từng Multiplex, nhiệt độ gắn mỗi dao động không nhiều 2-5°C, dễ dàng cho việc áp dụng chu trình nhiệt 2 bước. (2) Sử dụng kit My Taq™ HS Mix 2× (Meridian Bioscience, Đức) đã được tối ưu cho phù hợp với các phản ứng Multiplex-PCR và sử dụng chu trình nhiệt 2 bước, nên giúp tăng khoảng cách về nhiệt độ gắn mỗi giữa các cặp mỗi lên gấp đôi; trong khi nghiên cứu trước đây sử dụng chu trình nhiệt thông thường, nên chỉ tối ưu được các cặp mỗi có nhiệt độ gắn mỗi tương đối gần nhau. (3) Thiết kế lại mỗi khuếch đại gen *sbp1*, giúp tăng hiệu suất phản ứng Multiplex-PCR, làm giảm sự ức chế lẫn nhau giữa các cặp mỗi trong cùng một phản ứng Multiplex-PCR.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã tối ưu và phát triển phản ứng Multiplex-PCR cho xác định kiểu huyết thanh (sử dụng 1 phản ứng Multiplex-PCR) và xác định 14 gen độc lực (sử dụng 3 phản ứng Multiplex-PCR) của vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi vằn ở Việt Nam. Kết quả sẽ được ứng dụng để sàng lọc kiểu huyết thanh và xác định gen độc lực của 23 chủng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập từ 4 tỉnh Hà Tĩnh, Phú Thọ, Bắc Ninh, Yên Bái; kết hợp với kết quả xác định liều gây

chết LD₅₀, nhằm lựa chọn những chủng vi khuẩn mang độc lực cao, là vật liệu trong phát triển chỉ thị phân tử trong nghiên cứu chọn giống cá rô phi vẫn kháng bệnh xuất huyết.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 08/2019/TN. Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Trung tâm Quan trắc và cảnh báo môi trường dịch bệnh (CEDMA, RIA1) đã cung cấp và lưu giữ 03 chủng vi khuẩn *S. agalactiae* trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] FAO, *FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2019/FAO annuaire/Rome*, 2021.
- [2] W. Miao and W. Wang, "Trends of aquaculture production and trade: Carp, tilapia, and shrimp," *Asian Fisheries Science*, vol. 33, pp. 1-10, 2020, doi: 10.33997/j.afs.2020.33.S1.001.
- [3] M. Amal and M. N. A. Zamri-Saad, "Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review," *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, vol. 34, no. 2, pp. 195-206, 2011.
- [4] X. Ye, J. Li, M. Lu, G. Deng, X. Jiang, Y. Tian, Y. Quan, and Q. Jian, "Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China," *Fisheries Science*, vol. 77, pp. 623-632, 2011, doi: 10.1007/s12562-011-0365-4.
- [5] H. T. Dong, K. V. Nguyen, and H. T. Nguyen, "Some characteristics of *Streptococcus agalactiae*, causative agent of Streptococcosis disease of tilapia in Northern Vietnam," National Aquaculture Conference for Student and Young Scientists, Nha Trang university, 2011, pp. 348-356.
- [6] R. Imperi, M. Pataracchia, M. Alfarone, G. Baldassarri, L. Orefici, and G. Creti, "A multiplex PCR assays for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 80, pp. 212-214, 2010.
- [7] I. H. K. Kannika, D. Pisuttharachai, P. Srisapoome, J. Wongtavatchai, H. Kondo, and N. Areechon, "Molecular serotyping, virulence gene profiling and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia farms in Thailand by multiplex PCR," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 122, pp. 1497-1507, 2017.
- [8] F. S. Legario, C. H. Choresca, J. F. Turnbull, and M. Crumlish, "Isolation and molecular characterization of streptococcal species recovered from clinical infections in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the Philippines," *Journal of Fish Diseases*, vol. 43, pp. 1431-1442, 2020, doi: 10.1111/jfd.13247.
- [9] G. C. Chattopadhyay, D. Carey, A. J. Caliot, E. Webbd, R. I. Laytone, J. R. Wang, Y. Bohnsack, J. F. Adderson, and E. E. Ulett, "Phylogenetic Lineage and Pilus Protein Spb1/SAN1518 Affect Opsonin-Independent Phagocytosis and Intracellular Survival of Group B *Streptococcus*," *Microbes Infect*, vol. 13(4), pp. 369-382, 2011, doi: 10.1016/j.micinf.2010.12.009.
- [10] F. P. Y. Lin, R. Lan, V. Sintchenko, G. L. Gilbert, F. Kong, and E. Coiera, "Computational bacterial genome-wide analysis of phylogenetic profiles reveals potential virulence genes of *Streptococcus agalactiae*," *PLoS ONE*, vol. 6, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0017964.
- [11] C. M. J. Delannoy, R. N. Zadoks, M. Crumlish, D. Rodgers, F. A. Lainson, H. W. Ferguson, J. Turnbull, and M. C. Fontaine, "Genomic comparison of virulent and non-virulent *Streptococcus agalactiae* in fish," *Journal of Fish Diseases*, vol. 39, pp. 13-29, 2016, doi: 10.1111/jfd.12319.
- [12] L. Delannoy, C. M. J. Samai, and H. Labrie, "*Streptococcus agalactiae* serotype IV in farmed tilapia," *Aquaculture*, vol. 544, 2021, Art. no. 737033.
- [13] X. Zhang, D. Li, A. Guo, Y. Zhang, Q. Chen, and X. Gong, "Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* in diseased farmed tilapia in China," *Aquaculture*, vol. 412-413, pp. 64-69, 2013.
- [14] U. Chideroli, R. Amoroso, N. Mainardi, R. M. Suphoronski, S. A. Padua, A. B. Alfier, A. F. Alfier, A. A. Mosela, M. Moralez, A. T. P. Oliveira, A. G. Zanolo, R. Santis, and G. W. D. Pereira, "Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil," *Aquaculture*, vol. 479, pp. 45-51, 2017.
- [15] S. Zhang, Z. Lan, J. Li, Y. Hu, M. Yu, A. Zhang, and J. Wei, "The pathogenic and antimicrobial characteristics of an 2 emerging *Streptococcus agalactiae* serotype IX in Tilapia," *Microbial Pathogenesis*, vol. 4010, no. 17, 2018, doi: 10.1016/j.micpath.2018.05.053.

- [16] S. C. Sudpraseart, C. Wang, and P. C. Chen, "Phenotype, genotype and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from cultured tilapia (*Oreochromis spp.*) in Taiwan," *Journal of Fish Diseases*, pp. 1-10, 2020, doi: 10.1111/jfd.13296.
- [17] M. N. A. Syuhada, R. Zamri-Saad, M. Ina-Salwany, M. Y. Mustafa, M. Nasruddin, N. N. Desa, M. N. M. Nordin, S. A. Barkham, and T. Amal, "Molecular characterization and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* serotypes Ia ST7 and III ST283 isolated from cultured red hybrid tilapia in Malaysia," *Aquaculture*, vol. 515, 2020, Art. no. 734543.
- [18] C. T. Chamberlain, J. S. Gibbs, R. A. Ranier, J. E. Nguyen, and P. N. Caske, "Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification," *Nucleic Acids Research*, vol. 16, no. 23, pp. 11141-11156, 1988.
- [19] Bio-Rad, "Multiplex PCR". [Online]. Available: <https://www.bio-rad.com/featured/en/multiplex-pcr.html>. [Accessed May 15, 2022].
- [20] M. Järvinen, A. K. Laakso, S. Piiparinen, P. Aittakorpi, A. Lindfors, M. Huopaniemi, L. Piiparinen, and H. Mäki, "Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR- and microarray-based assay," *BMC Microbiology*, vol. 9, 2009, Art. no. 161, doi: 10.1186/1471-2180-9-161.
- [21] D. H. Myakishev, M. V. Khripin, and Y. Hamer, "High-Throughput SNP Genotyping by Allele-Specific PCR with Universal Energy-Transfer-Labeled Primers," *Genome Research*, vol. 11, no. 1, pp. 163-169, 2001.
- [22] D. Morlan, J. Baker, and J. Sinicropi, "Mutation Detection by Real-Time PCR: A Simple, Robust and Highly Selective Method," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 2, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0004584.
- [23] K. J. Hayden, M. J. Nguyen, T. M. Waterman, and A. Chalmers, "Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping," *BMC Genomics*, vol. 9, 2008, Art. no. 80, doi: 10.1186/1471-2164-9-80.
- [24] A. A. Laith, M. A. Ambak, M. Hassan, S. M. Sheriff, M. Nadirah, A. S. Draman, W. Wahab, W. N. W. Ibrahim, A. S. Aznan, A. Jabar, and M. Najjah, "Molecular identification and histopathological study of natural *Streptococcus agalactiae* infection in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*)," *Veterinary World*, vol. 10, pp. 101-111, 2017, doi: 10.14202/vetworld.2017.101-111.
- [25] M. Imperi, M. Pataracchia, G. Alfarone, L. Baldassarri, G. Orefici, and R. Creti, "A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 80, pp. 212-214, 2010, doi: 10.1016/j.mimet.2009.11.010.
- [26] G. P. G. Holleley, "Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR," *Biotechniques*, vol. 46, no. 7, pp. 511-517, 2009, doi: 10.2144/000113156.