

ĐẶC ĐIỂM SINH HÓA VÀ DI TRUYỀN CỦA VI KHUẨN *Streptococcus iniae* GÂY BỆNH LỖI MẮT TRÊN CÁ CHỀM *Lates calcarifer* (Bloch, 1790)

Nguyễn Thị Thanh Thủy*, Nguyễn Thị Quế Chi, Lê Hồng Tuấn, Nguyễn Văn Hùng

Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III

TÓM TẮT

Nghiên cứu cung cấp thông tin về đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và di truyền của 25 chủng vi khuẩn *S. iniae* phân lập từ cá chêm *Lates calcarifer* bệnh tại các vùng nuôi ở các tỉnh Khánh Hòa, Kiên Giang, Vũng Tàu, Quảng Ninh và Hải Phòng. Các đặc điểm sinh hóa được xác định bằng kit API 20 strep, Slidex Strepto Plus (BioMerieux, Pháp), các đặc điểm di truyền bao gồm xác định sự hiện diện của 2 gen mục tiêu định danh loài *lctO* và *16S-23S ITS rDNA* và 7 gen mã hóa độc tố bằng các cặp mồi đặc hiệu, thực hiện theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Kết quả nghiên cứu ghi nhận về đặc điểm hình thái, *S. iniae* có tế bào hình cầu, nối dài tạo thành chuỗi, thuộc Gram dương, khuẩn lạc 1-1,5 mm, có màu xanh đặc trưng khi nuôi cấy trên ChromAgar Streptococcus. Phản ứng sinh hóa ghi nhận *S. iniae* âm tính với oxidase, catalase, VP, HIP, LDC, Bile ESC và SOR; Dương tính ESC, PYRA, LAP và TRE; Biến đổi ở các phản ứng PAL, ADH, RIB, ARA, MAN, LAC, INU, RAF, AMD và GLYG. Kiểm tra các kiểu huyết thanh theo nhóm Lancefield ghi nhận các chủng đều âm tính; 22 chủng có kiểu dung huyết beta (chiếm 88%), chỉ 3 chủng kiểu alpha (chiếm 12%). Các chủng *S. iniae* phát triển ở độ mặn 0% nhưng không phát triển ở 6,5%; Một số ít chủng *S. iniae* phát triển ở được ở 10°C, không phát triển ở 45°C. Về đặc điểm di truyền, 100% chủng dương tính với 2 cặp mồi đặc hiệu *Lox(F/R)* và *SP1/SP1* tương ứng với 2 gen mục tiêu *lctO* và *16S-23S ITS rDNA*; có 15/25 chủng có từ 3 gen mã hóa độc tố trở lên và chỉ có 1 chủng *SiTH1* hiện diện 6/7 gen khảo sát. Kết quả của nghiên cứu cung cấp dữ liệu khoa học về đặc điểm sinh học, phương pháp định danh dựa trên phân tử và các yếu tố quyết định độc lực của vi khuẩn *S. iniae*. Tuy nhiên, cần tiếp tục xác định khả năng gây bệnh thực nghiệm từ các chủng chứa gen độc tố nhằm chọn lựa chủng thích hợp cho sản xuất vaccine phòng bệnh do *S. iniae* ở cá chêm.

Từ khóa: Gen độc tố, *Lates calcarifer*, *lctO*, *16S-23S ITS rDNA*, *Streptococcus iniae*.

MỞ ĐẦU

Trên thế giới, bệnh do nhóm vi khuẩn *Streptococcus* spp. đã và đang gây nguy hiểm cho nhiều loài cá nước lợ, mặn và nước ngọt, làm thiệt hại kinh tế cho nghề nuôi thủy sản hàng năm lên đến 150 triệu đô la (Romalde *et al.*, 2009). Trong đó, loài *Streptococcus iniae* được báo cáo là tác nhân gây bệnh cho ít nhất 27 loài cá nước ngọt và cá biển ở 15 quốc gia khác nhau thuộc 4 châu lục, gồm châu Phi, châu Á, châu Úc và châu Âu (Hossain *et al.*, 2014; Agnew, Barnes, 2007). Trên cá chêm *Lates calcarifer*, bệnh do *S. iniae* được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1999 tại Úc (Bromage *et al.*, 1999), tiếp tục xuất hiện năm 2006 (Creep, Buller, 2006) và tại Thái Lan ghi nhận bệnh này trên cá chêm vào năm 2010 (Suanyuk *et al.*, 2010). Tại Việt Nam, phát hiện *S. iniae* gây bệnh cho cá chêm nuôi lồng tại Khánh Hòa (Hich *et al.*, 2013), tại Thừa Thiên Huế (Trương Thị Hoa *et al.*, 2018) đã gây thiệt hại kinh tế lớn cho người nuôi. Dấu hiệu bệnh lý thường gặp ở cá bệnh là bơi lội bất thường ở gần mặt nước hoặc bơi xoắn, thân trở nên sẫm màu hơn, xuất huyết ở thân, gốc vây, hậu môn, mắt lồi, đục. Giải phẫu nội quan thường gặp sự tích dịch ở khoang bụng, gan, thận, lách sưng phù, đôi khi xuất huyết. Bệnh do *S. iniae* có thể gây ra tỷ lệ chết lên đến 70% ở giai đoạn cá chêm giống (Suanyuk *et al.*, 2010; Creeper, Buller, 2006).

S. iniae thuộc nhóm Gram dương, tế bào hình cầu, đường kính nhỏ hơn 2 µm, thường ghép với nhau thành chuỗi dài nên được gọi là liên cầu khuẩn. Đặc điểm sinh hóa đặc trưng của vi khuẩn này là luôn âm tính với các phản ứng catalase, oxidase, VP và indol, nhạy cảm với bacitracin. Tuy nhiên, nếu chỉ dựa vào những phản ứng sinh hóa truyền thống sẽ dễ gây nhầm lẫn trong việc định danh loài vi khuẩn này. Và phương pháp sinh học phân tử là giải pháp đáng tin cậy. Trong đó, ngoài việc giải trình tự và định danh bằng gen *16S rDNA*, các gen mục tiêu mang tính bảo tồn cao của loài như gen mã hóa lactate oxidase (*lctO*) (Mata *et al.*, 2004) và *ITS rDNA (16S-23S rDNA intergenic spacer region)* (Zhou *et al.*, 2011) đã được sử dụng định danh loài *S. iniae* một cách nhanh chóng. Đây được xem là đặc điểm di truyền mang dấu ấn của loài.

Bên cạnh đó, đặc điểm di truyền của vi khuẩn *S. iniae* còn thể hiện ở việc mang các gen mã hóa độc tố. Sự hiện diện của các gen này góp phần đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn *S. iniae* (Baums *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2017). Một số gen liên quan đến yếu tố độc lực của vi khuẩn *S. iniae* và cơ chế gây độc như: gắn kết, xâm nhập và thoát khỏi quá trình thực bào (gen *simA*) (Locke *et al.*, 2008); ức chế khả năng thực bào (gen *cpsD*, *cpsA*, *cpsY*) (Locke *et al.*, 2008; Lowe *et al.*, 2007); tạo thành tế bào cứng chắc, trốn khỏi peptide kháng khuẩn (gen *pgmA*) (Buchanan *et al.*, 2005); gây tổn thương tế bào (gen *sagA*, *sagB*) (Locke *et al.*, 2007; Fuller *et al.*, 2002).

Như vậy, vi khuẩn *S. iniae* chứa yếu tố gây độc quy định bởi các gen với các chức năng đảm nhiệm các vai trò khác nhau nhằm thực hiện quá trình xâm nhiễm và gây bệnh cho cá.

Với mục tiêu sàng lọc chủng vi khuẩn *S. iniae* phù hợp cho việc sản xuất vaccine phòng bệnh cho cá chêm, nghiên cứu này cung cấp dữ liệu về đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và di truyền của 25 chủng vi khuẩn *S. iniae* phân lập từ cá chêm bệnh nuôi thương phẩm trên nhiều vùng địa lý khác nhau tại Việt Nam.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vi khuẩn nghiên cứu

Vi khuẩn nghiên cứu gồm 25 chủng *S. iniae* có nguồn gốc phân lập từ cá chêm bệnh tại Khánh Hòa, Kiên Giang, Vũng Tàu, Quảng Ninh, Hải Phòng, được lưu giữ tại Phòng Công nghệ sinh học và vắc xin thủy sản- Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III. Tất cả các chủng *S. iniae* nghiên cứu được định danh bằng phương pháp so sánh trình tự gen *16S rDNA* với các trình tự tham chiếu có sẵn trên GenBank, nhờ công cụ nucleotide-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), tỉ lệ tương đồng từ 96-100%.

Chủng chuẩn *S. iniae* ATCC29178 (DSMZ, Đức).

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu đặc điểm sinh thái, sinh lý, sinh hóa vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được nuôi phục hồi, tăng sinh trong môi trường BHI broth hoặc TSB (bổ sung 1,5% NaCl) (Merck, Đức) ở 28 – 30 °C trong 24-36 h sử dụng cho nghiên cứu. Hình thái vi khuẩn được xác định qua tiêu bản nhuộm Gram dưới kính hiển vi (CX31J, Olympus) ở độ phóng đại 1.000 lần và khuẩn lạc trên các môi trường tổng hợp BHIA, TSA và môi trường đặc trưng CHROMagar Streptococcus (CHROMagar, Pháp). Các chỉ tiêu sinh hóa được xác định bằng bộ kit API 20 strep (BioMerieux, Pháp) thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đặc điểm cơ bản khác gồm catalase, oxidase, khả năng khử carboxyl của lysin (LDC) và thủy giải esculine (Bile ESC) xác định bằng kit test (Công ty Nam Khoa). Khả năng chịu muối, chịu nhiệt dựa trên tăng sinh của vi khuẩn trên môi trường BHI. Khả năng dung huyết của vi khuẩn được khảo sát trên môi trường thạch máu (Blood agar base – BA, Difco) bổ sung 1,5 % NaCl và 5 % máu thỏ. Kiểu huyết thanh được xác định bằng phản ứng ngưng kết miễn dịch theo phương pháp của Lancefield bằng bộ kit Slidex Strepto Plus (BioMerieux, Pháp). Các phản ứng được thực hiện đồng thời với chủng chuẩn ATCC29178 (DSMZ, Đức) trong cùng điều kiện.

Phương pháp nghiên cứu đặc điểm di truyền vi khuẩn

Vi khuẩn sau khi nuôi tăng sinh được ly tâm ở 6.000 rpm/10 phút/4°C. Thu hồi phần vi khuẩn kết lắng, tiến hành tách chiết DNA bằng bộ kit GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo, Mỹ), các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sản phẩm DNA sử dụng cho các phản ứng PCR sau.

Khảo sát sự hiện diện các đoạn gen đặc trưng của vi khuẩn *S. iniae*, gồm đoạn gen *ITS rDNA* và lactate oxidase (*lctO*), thông tin chi tiết ở Bảng 1.

Bảng 1. Thông tin các đoạn gen khảo sát và phản ứng PCR

Gen	Trình tự mồi (5'-3')	Phản ứng PCR	Kích thước sản phẩm (bp)	Nguồn tham khảo
<i>ITS rDNA</i>	SP1-GAAAATAGGAAAGAGACGCAGTGTC SP2- CCTTATTTCCAGTCTTTTCGACCTTC	Tổng thể tích 25 µL với vòng lặp 35 chu kỳ gồm 94°C trong 1 phút, 60°C trong 1 phút và 72°C trong 1 phút. Hoàn tất kéo dài mạch ở 72°C trong 5 phút.	377	Zhou <i>et al.</i> (2011)
<i>lctO</i>	LOXF- AAGGGGAAATCGCAAGTGCC; LOXR- ATATCTGATTGGGCCGTCTAA	Tổng thể tích 25 µL với vòng lặp 35 chu kỳ gồm 94°C trong 1 phút, 58°C trong 1 phút và 72°C trong 1 phút. Hoàn tất kéo dài mạch ở 72°C trong 5 phút.	870	Mata <i>et al.</i> (2004)

Các gen mã hóa protein độc tố của *S. iniae*, bao gồm *simA*, *pdi*, *pgm*, *cpsD*, *scpl*, *sagA* và *cpsA* được khảo sát bằng phản ứng PCR với các cặp mồi tương ứng. Thông tin chi tiết được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Thông tin phản ứng PCR khuếch đại gen mã hóa độc tố

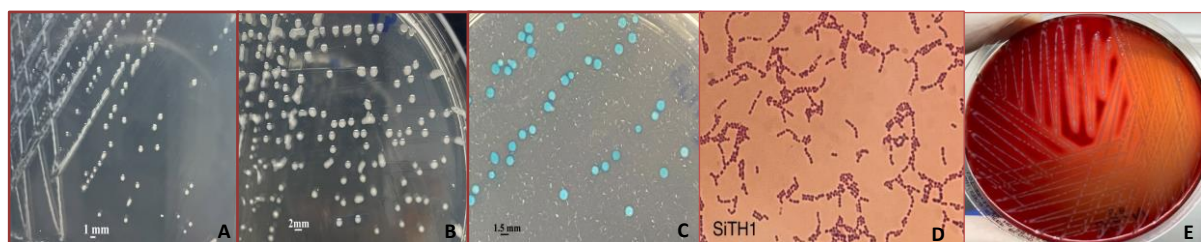
Gen	Trình tự mồi (5'-3')	Kích thước sản phẩm (bp)	Chu trình nhiệt phản ứng PCR	Nguồn tham khảo
<i>simA</i>	F- AATTCGCTCAGCAGGTCTTG R- AACCAT AACCGCATAGCAC	994	Biến tính ở 94°C/ 2 phút; 30 chu kỳ: 94°C/1phút, 58°C/ 1 phút, 72°C/ 1 phút; Hoàn tất kéo dài mạch ở 72°C/ 2 phút.	Baums <i>et al.</i> (2013) Deng <i>et al.</i> (2017)
<i>pdi</i>	F- TTTCGACGACAGCATGATTG R- GCTAGCAAGGCCTTCATTTG	381		
<i>pgm</i>	F- TATTAGCTGCTCACGGCATC R- TTAGGGTCTGCTTTGGCTTG	713		
<i>cpsD</i>	F-TGGTGAAGGAAAGTCAACCAC R-TCTCCGTAGGAACCGTAAGC	534		
<i>scpl</i>	F- GCAACGGGTTGTCAAAAATC R- TTAGGGTCTGCTTTGGCTTG	822		
<i>sagA</i>	F-AGGAGGTAAGCGTTATGTTAC R-AAGAAGTGAATTACTTTGG	190		
<i>cpsA</i>	F-ACGCAACTGACGAGTGTGAC R- GATCGCGACACCGAACTAAT	353	Biến tính ở 94°C/ 5 phút; 30 chu kỳ: 94°C/ 1 phút, 58°C/ 30 giây, 72°C/ 40 giây; Hoàn tất kéo dài mạch ở 72°C/10 phút.	Park <i>et al.</i> (2010)

Điện di sản phẩm PCR kèm theo thang chuẩn 1 Kb trên gel agarose 1,5% trong dung dịch đệm TBE 1X ở 110 Volt trong 20 phút. Đọc kết quả điện di trên máy soi gel UV, kiểm tra sự có mặt của sản phẩm PCR tương ứng với kích thước sản phẩm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn *S. iniae*

Hình thái vi khuẩn *S. iniae* qua tiêu bản nhuộm Gram cho thấy tế bào bắt màu xanh tím (thuộc Gr +), hình cầu, kết nối thành dạng chuỗi. Khuẩn lạc vi khuẩn *S. iniae* trên môi trường ChromAgar Streptococcus có màu xanh đặc trưng, hình tròn, lồi, bóng, đường kính từ 1-1,5 mm sau 48 giờ nuôi ở nhiệt độ 30°C (Hình 1). Đặc điểm sinh hóa của 25 chủng *S. iniae* cho thấy âm tính với oxidase, catalase, VP, HIP, LDC, Bile ESC và SOR; Dương tính với ESC, PYRA, LAP và TRE; Biến đổi ở các phản ứng PAL, ADH, RIB, ARA, MAN, LAC, INU, RAF, AMD và GLYG. Kiểm tra các kiểu huyết thanh theo nhóm Lancefield A, B, C, D, F, G của 25 chủng *S. iniae* ghi nhận đều âm tính; 22 chủng có kiểu dung huyết beta (chiếm 88%), 3 chủng có kiểu alpha (chiếm 12%). Về khả năng chịu nhiệt, 25 chủng *S. iniae* phát triển được khi nuôi cấy ở 32°C, một số ít phát triển được ở 10°C, không phát triển ở 45°C. Về khả năng chịu muối cho thấy 25 chủng *S. iniae* phát triển được ở độ mặn 0 % nhưng không phát triển ở độ mặn 6,5 %. Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của 25 chủng vi khuẩn *S. iniae* so sánh với chủng chuẩn ATCC29178 được tổng hợp ở Bảng 3.



Hình 1. Đặc điểm hình thái vi khuẩn *S. iniae*
(Khuẩn lạc trên môi trường TSA (A); BHI (B); ChromStrep (C), Gram (D); Dung huyết beta (E))

Bảng 3. Đặc điểm các chủng *S. iniae* phân lập từ cá chẻm bệnh

Các phản ứng kiểm tra		ATCC 29178	Tỷ lệ kiểm tra trên 25 chủng (%)		
			Dương	Âm	Hình thái
Đặc điểm cơ bản	Hình dạng tế bào	Tế bào cầu chuỗi, rải rác có tế bào hơi ovan			Tế bào cầu chuỗi, rải rác có tế bào hơi ovan
	Gram	+	100		
	Kiểu dung huyết	B	88	12	22/25 kiểu β; 3/25 kiểu α.
	Khuẩn lạc trên Chrom Strep	Xanh lá đậm, lồi tròn, bóng, đường kính 1-1,5mm.			Xanh lá đậm, lồi tròn, bóng, đường kính 1-1,5mm.
	Khuẩn lạc trên TSA	Trắng đục, đường kính 1-1,5 mm.			Trắng đục, đường kính 1-1,5 mm.
	Oxidase	-		100	
	Catalase	-		100	
	LDC	-		100	
Khả năng chịu nhiệt	10°C	-	20	80	
	32°C	+	100		
	45°C	-		100	
Khả năng chịu muối	0 %	+	100		
	6,5 %	-		100	
Đặc điểm sinh hóa kiểm tra bằng kit API 20 STREP	VP	-		100	
	HIP	-		100	
	ESC	+	100		
	PYRA	+	100		
	αGAL	-		100	
	βGUR	-	16	84	
	βGAL	-		100	
	PAL	-	80	20	
	LAP	+	100		
	ADH	+	80	20	
	RIB	+	88	12	
	ARA	-	8	92	
	MAN	+	16	84	
	SOR	-		100	
	LAC	-	8	92	
	TRE	+	100		
	INU	-	8	92	
	RAF	-	8	92	
AMD	+	84	16		
GLYG	-	80	20		

So sánh với các nghiên cứu khác về *S. iniae* phân lập từ cá chẻm bệnh ở Huế (Trương Thị Hoa *et al.*, 2018), ở Khánh Hòa (Hich *et al.*, 2013) hay *S. iniae* phân lập trên cá rô đồng tại ĐBSCL (Từ Thanh Dung *et al.*, 2013) cũng cho kết quả tương tự ở phần lớn các phản ứng sinh hóa. Một vài khác biệt về khả năng chịu nhiệt và chịu mặn, cụ thể, 100% chủng *S. iniae* phân lập từ cá chẻm tại Huế phát triển được ở 10°C và không phát triển được ở 0% (Trương Thị Hoa *et al.*, 2018); Hay 100% chủng *S. iniae* phân lập từ cá rô đồng phát triển được ở độ mặn

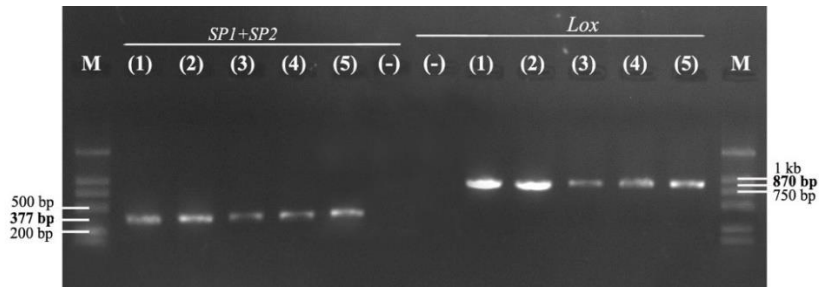
6,5% (Từ Thanh Dung *et al.*, 2013). Trong khi chủng thuộc nghiên cứu này phát triển được ở 0% nhưng không phát triển ở 6,5%, nhiệt độ 10°C chỉ một số ít phát triển, đa số không phát triển. Sự khác biệt này có thể do khác biệt về địa lý nguồn gốc phân lập và cá kỷ chủ.

Theo Lau *et al.* (2003), Buller (2004) việc định danh *S. iniae* bằng các bộ kit sinh hóa thường nhầm lẫn với loài *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* do đa số các đặc điểm sinh hóa của 2 loài vi khuẩn này rất giống nhau. Hơn nữa, cho đến nay, *S. iniae* không có trong cơ sở dữ liệu định danh của các bộ kit API 20 Strep hay Rapid ID 32 Strep (Lau *et al.*, 2003; Agnew, Barnes, 2007). Chính vì thế, kết hợp thực hiện giải trình tự gen *16S rDNA* hoặc khảo sát gen đặc hiệu loài *S. iniae* bằng PCR là giải pháp tối ưu nhằm định danh chính xác loài này.

Đặc điểm di truyền của vi khuẩn *S. iniae*

Kết quả khảo sát gen đặc hiệu định danh *S. iniae*

Bên cạnh phương pháp giải trình tự gen *16S rDNA* của vi khuẩn *S. iniae*, phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu với đoạn gen mục tiêu *ITS rDNA* và *IctO* là hai gen mang tính bảo tồn cao giúp cho việc định danh loài nhanh và hiệu quả nhất (Mata *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2011). Kết quả điện di sản phẩm PCR với 2 cặp mồi đặc hiệu SP1/SP2 và LOXF/LOXR trên mẫu DNA tổng số của 25 chủng *S. iniae* nghiên cứu cho thấy 100% các chủng đều hiện diện hai đoạn gen mục tiêu *ITS rDNA* và *IctO* với kích thước sản phẩm PCR tương ứng khoảng 377 bp và 870 bp (Hình 2).



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR các chủng vi khuẩn với 2 cặp mồi SP1/SP2 và LoxF/R
(M. 100bp ladder (*Phusagenomics*); 1. Chủng chuẩn; 2. SiTH1; 3. SiTH6; 4. SiTH19; 5. SiTH25; -. Mẫu nước cất)

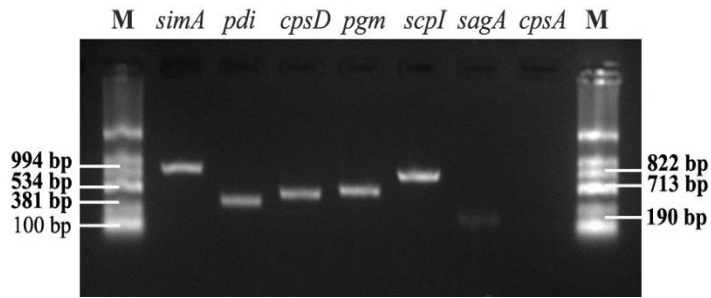
Một vài nghiên cứu trước đây cũng cho kết quả PCR dương tính với cặp mồi đặc hiệu LoxF/loxR đối với các chủng *S. iniae* như Creeper, Buller (2006), Suanyuk và đồng tác giả (2010), Rodkhum và đồng tác giả (2012). Năm 2011, Zhou và đồng tác giả (2011) đã thiết kế một cặp mồi đặc hiệu dựa trên trình tự đoạn gen *16S-23S ITS rDNA* để định danh nhanh loài *S. iniae*. Và cặp mồi này chỉ đặc hiệu cho loài *S. iniae*, không tạo ra sản phẩm PCR đối với DNA của các loài khác cùng chi như *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis* và một số loài dễ nhầm lẫn như *Lactococcus garveiae*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Nocardia seriolae*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alguillarum*, *Aeromonas hydrophila*. Từ đó cho thấy hai cặp mồi đặc hiệu này mang lại hiệu quả cao và đáng tin cậy trong định danh nhanh vi khuẩn *S. iniae*.

Kết quả khảo sát gen mã hóa độc tố

Vi khuẩn *S. iniae* chứa yếu tố gây độc quy định bởi các gen đảm nhiệm các vai trò khác nhau nhằm thực hiện quá trình xâm nhiễm và gây bệnh cho cá. Trong nghiên cứu này, khảo sát các gen mã hóa độc tố trên 25 chủng *S. iniae* phân lập từ cá chẻm bệnh, kết quả minh chứng sự hiện diện các gen độc tố ở Hình 3 và thống kê tần suất phát hiện các gen ở các chủng phân lập từ cá nuôi tại các vùng khác nhau thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát gen mã hóa độc tố của 25 chủng *S. iniae*

Số gen phát hiện	0 gen	1 gen	2 gen	3 gen	4 gen	5 gen	6 gen	7 gen	Tổng
Số chủng	4	5	1	6	4	4	1	0	25
Tỷ lệ %	16	20	4	24	16	16	4	0	100
Tên chủng	SiTH15; SiTH16; SiTH20; SiTH21	SiTH17;SiTH18; SiTH22;SiTH23; SiTH24	SiTH7	SiTH5 SiTH6 SiTH8 SiTH9 SiTH11 SiTH12	SiTH10 SiTH13 SiTH14 SiTH19	SiTH2; SiTH3; SiTH4; SiTH25	SiTH1		
Nguồn gốc phân lập	Kiên Giang; Vũng Tàu	Kiên Giang; Vũng Tàu, Quảng Ninh	Cam Lâm-Khánh Hòa	Ninh Hòa-Cam Lâm-Nha Trang-Khánh Hòa	Khánh Hòa; Kiên Giang	Vạn Ninh-Khánh Hòa; Hải Phòng	Vạn Ninh-Khánh Hòa		



Hình 3. Kết quả khảo sát các gen mã hóa độc tố ở chủng vi khuẩn *S. iniae* SiTH1

(*simA* (M-like protein SiM): Kết dính, xâm nhập, phát triển; *pdi* (Peptidoglycan deacetylase): Bảo vệ chống lại sự phân giải lysozyme; *pgm* (Phosphoglucosmutase): chống lại enzyme, peptide kháng khuẩn; *sagA* (Streptolysin S): Tổn thương tế bào vật chủ; *cpsA*, *cpsD*, *scpl* (Polysaccharide ngoại bào): Thoát khỏi hiện tượng thực bào).

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vi khuẩn *S.iniae* chứa yếu tố gây độc quy định bởi các gen với các chức năng đảm nhiệm các vai trò khác nhau nhằm thực hiện quá trình xâm nhiễm và gây bệnh cho cá. Cơ chế gây độc thể hiện qua các đặc tính do các gen quy định như: Quy tụ và kết dính vào tế bào vật chủ, xâm nhập và phát triển (M- like protein SiM, *simA*); Gây tổn thương tế bào vật chủ (gen streptolysin S (*sagA*; *sagB*)); Vượt qua hệ thống miễn dịch, thoát khỏi hiện tượng thực bào và tồn tại trong tế bào miễn dịch (lớp bao nang polysaccharide ngoại bào; gen *cpsA*, *cpsY*, *cpsD*); Chống lại các enzyme và peptide kháng khuẩn (enzyme phosphoglucosmutase (*pgm*)); Bất hoạt tín hiệu các phân tử miễn dịch của vật chủ (protease vô tế bào (*cepl*)); Điều hòa gen độc lực (*cpsY*) (Locke *et al.*, 2008; Locke *et al.*, 2007; Buchanan *et al.*, 2005). Kết quả ở Hình 3 cho thấy sự hiện diện của các gen này có ở các chủng vi khuẩn *S.iniae* phân lập trên cá chẻm bệnh tại Việt Nam.

Về tần suất phát hiện, kết quả khảo sát ở Bảng 4 cho thấy, đa số các chủng có từ 3 gen độc tố trở lên (15/25 chủng) và chỉ có 1 chủng chứa 6/7 gen khảo sát (SiTH1). Chủng chứa số lượng gen độc tố càng nhiều có liên quan đến khả năng xâm nhập gây bệnh cho cá bằng các cơ chế và mức độ gây hại cũng khác nhau. Một chủng chứa đa dạng các gen độc tố luôn là ứng viên tốt cho việc sàng lọc tuyển chọn chủng đại diện nghiên cứu sản xuất vaccine. Xét về nguồn gốc phân lập, kết quả ở Bảng 4 cho thấy đa số các chủng chứa gen độc tố phân lập từ cá chẻm bệnh nuôi tại Khánh Hòa, vài chủng tại Kiên Giang, Hải Phòng. Các chủng phân lập từ Vũng Tàu không phát hiện gen độc tố. Baums *et al.* (2013) khảo sát gen độc tố của chủng *S. iniae* K288 phân lập từ cá rô phi sông Nile (*Oreochromis niloticus*), cho thấy hiện diện của 6 gen mã hóa độc tố (*simA*, *scpl*, *pdi*, *pgm*, *cpsD* và *sagA*). Tương tự, Deng và đồng tác giả (2017) cũng phát hiện 6 gen mã hóa độc tố này trên 2 chủng *S. iniae* Ab130920 và *S. iniae* Ab131025 phân lập từ cá tầm Siberian (*Acipenser baerii*) tại Trung Quốc. Các nghiên cứu này cũng khẳng định các chủng chứa đa số gen độc tố thường là những chủng có độc lực cao khi cảm nhiễm thực nghiệm trên cá khoẻ.

KẾT LUẬN

Vi khuẩn *S. iniae* thuộc Gr +, hình cầu, kết nối thành dạng chuỗi; Khuẩn lạc *S. iniae* trên môi trường ChromAgar Streptococcus có màu xanh đặc trưng, hình tròn, lồi, bóng, đường kính từ 1-1,5 mm sau 48 giờ nuôi ở nhiệt độ 30°C; *S. iniae* âm tính với oxidase, catalase, VP, HIP, LDC, Bile ESC và SOR; Dương tính ESC, PYRA, LAP và TRE; Biến đổi ở các phản ứng PAL, ADH, RIB, ARA, MAN, LAC, INU, RAF, AMD và GLYG; Kiểm tra các kiểu huyết thanh theo nhóm Lancefield A, B, C, D, F, G, các chủng *S. iniae* đều ghi nhận âm tính; 22 chủng có kiểu dung huyết beta (chiếm 88%), 3 chủng có kiểu alpha (chiếm 12%); Các chủng *S. iniae* phát triển được độ mặn 0%, một số ít phát triển ở 10°C, trong khi không phát triển được ở 45°C, độ mặn 6,5%.

100% các chủng *S. iniae* dương tính trong phản ứng PCR với 2 cặp mồi đặc hiệu Lox(F/R) và SP1/SP1 tương ứng với 2 gen mục tiêu *lctO* và *16S-23S ITS rDNA*. Kết quả khảo sát sự hiện diện của 7 gen mã hóa độc tố cho thấy 15/25 chủng có từ 3 gen mã hóa độc tố trở lên và chỉ có 1 chủng SiTH1 có 6/7 gen khảo sát. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở để tuyển chọn chủng đại diện nghiên cứu sản xuất vaccine. Cần tiếp tục đánh giá khả năng gây bệnh trên cá khoẻ ở những chủng chứa nhiều gen độc tố nhằm chọn chủng thích hợp sản xuất vaccine phòng bệnh cho cá chẻm.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu trên là một phần kết quả thuộc đề tài “Nghiên cứu chế tạo vaccine vô hoạt phòng bệnh do *Streptococcus iniae* ở cá chẻm *Lates calcarifer*”, do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã cấp kinh phí và Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản III chủ trì thực hiện. Nhóm tác giả xin bày tỏ lòng biết ơn đến sự hỗ trợ kinh phí và cho phép sử dụng số liệu thuộc nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agnew W, Barnes AC (2007). *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*, 122: 1–15.
- Baums CG, Hermeyer K, Leimbach S, Adamek M, Czerny CP, Hörstgen-Schwarck G, Valentin-Weigand P, Baumgärtner W, Steinhagen D (2013). Establishment of a Model of *Streptococcus iniae* Meningoencephalitis in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J.Comp.Path*, vol 149, 94-102.
- Bromage E, Thomas A, Owens L (1999). *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Disease of aquatic organisms*. 36: 177-181.
- Buchanan JT Stannard JA, Lauth X, Ostland VE, Powell HC, Westerman ME, Nizet V (2005). *Streptococcus iniae* phosphoglucosyltransferase is a virulence factor and a target for vaccine development. *Infection and immunity*, 73(10): 6935-6944.
- Buller BN (2004). Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals-A Practical Identification Manual. *CABI Publishing*. 390pp.
- Creeper JH, Buller NB (2006). An outbreak of *Streptococcus iniae* in barramundi (*Lates calcarifera*) in freshwater cage culture. *Australian Veterinary Journal*. Vol 84, no 11. 408-411.
- Deng M, Yu Z, Geng Y, Wang K, Chen D, Huang X, Ou Y, Chen Z, Zhong Z, Lai W (2017). Outbreak of Streptococcosis associated with *Streptococcus iniae* in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) in China. *Aquaculture Research*, 48: 909-919.
- Fuller JD, Camus AC, Duncan CL, Nizet V, Bast DJ, Thune RL, De Azavedo JC (2002). Identification of a streptolysin S-associated gene cluster and its role in the pathogenesis of *Streptococcus iniae* disease. *Infection and immunity*, 70(10), 5730-5739.
- Hich TV, Quyen VDH, Dung NH, Wergeland HI (2013). Experimental *Streptococcus iniae* infection in barramundi (*Lates calcarifer*) cultured in Vietnam. *International Journal of Aquatic Science*. 4(1): 3-12.
- Hossain MMM, Ehsan A, Rahman MA, Haq M, Chowdhury MBR (2014). Transmission and pathology of *Streptococcus inane* in monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in aquaculture of Bangladesh. *Journal of Fisheries*, 2(1), 90-99.
- Lau PKS, Woo PCY, Tse H, Leung KW, Wong SSY, Yuen KY (2003). Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:1004–1009.
- Locke JB, Aziz RK, Vicknair MR, Nizet V, Buchanan JT (2008). *Streptococcus iniae* M-like protein contributes to virulence in fish and is a target for live attenuated vaccine development. *PLoS one*, 3(7): 24-28.
- Locke JB, Colvin KM, Vark N, Vicknair MR, Nizet V, Buchanan JT (2007). *Streptococcus iniae* β -hemolysin streptolysin S is a virulence factor in fish infection. *Diseases of aquatic organisms*, 76(1): 17-26.
- Lowe BA, Miller JD, Neely MN (2007). Analysis of the polysaccharide capsule of the systemic pathogen *Streptococcus iniae* and its implications in virulence. *Infection and immunity*, 75(3): 1255-1264.
- Mata AI, Blanco MM, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF, Gibello A (2004). Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (*lctO*) gene with potential diagnostic value. *Veterinary Microbiology*, 101: 109-116.
- Park HK, Lee S, Yoon JW, Shin JW, Shin H, Kook J, Myung SC, Kim W (2010). Identification of the *cpsA* gene as a specific marker for the discrimination of *Streptococcus pneumoniae* from viridans group streptococci. *J Med Microbiol*, 59 (10): 1146-1152.
- Rodkhum C, Kayansamruaj P, Priarat N, Wongtawatchai J (2012). Duplex PCR for simultaneous and unambiguous detection of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactice* associated with Streptococcosis of cultured Tilapia in Thailand. *Thai J Vet Med*, 42(2), 153-158.
- Romalde LJ, Magarinos B, Ravelo C, Toranzo AE (2009). Vaccination strategies to prevent Streptococcal infections in cultured fish. Zacccone G, Perriere C, Mathis A, Kappoor BG, eds. Fish defenses. Vol (2) Pathogens, parasites and predators. *Science publishers*. 403pp.
- Suanyuk N, Sukkasame N, Tanmark N, Yoshida T, Itami T, Thune RL, Tantikitti C, Supamattaya K (2010). *Streptococcus iniae* infection in culture Asian sea bas (*Lates calcarifer*) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) in southern Thailand. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 32 (4): 341-348.
- Trương Thị Hoa, Nguyễn Ngọc Phước, Đặng Thị Hoàng Oanh (2018). Nghiên cứu đặc điểm bệnh học của vi khuẩn *Streptococcus iniae* trên cá chẽm (*Lates calcarifer*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, tập 54, số 3B, tr.156-163.
- Từ Thanh Dung, Huỳnh Thị Ngọc Thanh, 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.
- Zhou SM, Fan Y, Zhu XQ, Xie MQ, Li AX (2011). Rapid identification of *Streptococcus iniae* by specific PCR assay utilizing genetic markers in ITS rDNA. *Journal of Fish Diseases*, 34: 265-271.

BIOCHEMICAL AND GENETIC CHARACTERISTICS OF *STREPTOCOCCUS INIAE* CAUSING POP-EYE DISEASE IN SEA BASS *LATES CALCARIFER* (BLOCH, 1790)

Nguyen Thi Thanh Thuy*, Nguyen Thi Que Chi, Le Hong Tuan, Nguyen Van Hung

Research Institute for Aquaculture No.3

SUMMARY

The study provides information on the morphological, physiological, biochemical, and genetic characteristics of 25 strains of *S. iniae* isolated from diseased seabass *Lates calcarifer* in farming areas in provinces of Vietnam such as Khanh Hoa, Kien Giang, Vung Tau, Quang Ninh, and Hai Phong. Biochemical characteristics were determined using API 20 strep kit, Slidex Strepto Plus (BioMerieux, France); Genetic characteristics included determining the presence of 2 target genes *lctO* and *16S-23S ITS rDNA* and 7 genes encoding toxins using specific primer pairs, following the manufacturer's instructions. Research results recorded that in terms of morphological characteristics, *S. iniae* has spherical cells, elongated to form chains, is Gram-positive, colonies with 1-1.5 mm diameter, and a typical green color on ChromAgar Streptococcus medium. Biochemical reactions showed that *S. iniae* strains were negative for oxidase, catalase, VP, HIP, LDC, Bile ESC and SOR; Positive ESC, PYRA, LAP, and TRE; Variabilities in PAL, ADH, RIB, ARA, MAN, LAC, INU, RAF, AMD and GLYG reactions. Lancefield serotype testing was negative in all strains; Most strains had a beta hemolytic type (88%), some strains had an alpha hemolytic type (12%). *S. iniae* grew at 0% salinity but not at 6.5%; A few grew at 10°C, but do not grow at 45°C. Regarding genetic characteristics, 100% of strains were positive with 2 specific primer pairs Lox(F/R) and SP1/SP1 corresponding to 2 target genes *lctO* and *16S-23S ITS rDNA*; There are 15/25 strains with more than three toxin-encoding genes and only SiTH1 strain has presented 6/7 surveyed genes. The results of the study provides basic scientific data on the biological characteristics, molecular-based identification and virulent factors of *S. iniae* bacteria. Furthermore, it is necessary to continue to determine the experimental pathogenicity of strains containing toxin genes in order to select suitable strains for vaccine production against *S.iniae* on seabass.

Keywords: Toxin-encoding genes, *Lates calcarifer*, *lctO*, *16S-23S ITS rDNA*, *Streptococcus iniae*.

* Author for correspondence: Tel: +84-975894976; Email: ngthuy@ria3.vn/ ngthuyria3@gmail.com.