



DOI:10.22144/ctujos.2024.269

AN TOÀN TRONG VẬN CHUYỂN, BẢO QUẢN VÀ PHÁT HIỆN *Streptococcus agalactiae* VÀ *Vibrio parahaemolyticus* TRÊN THẺ FTA BẰNG PCR

Nguyễn Diễm Thu*, Trương Nhật Nam, Lê Thị Kim Phượng và Đỗ Viết Phương

Trung tâm Công nghệ Thủy sản Virbac (VATC), Virbac Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): thu_seven@yahoo.com

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 03/10/2023

Sửa bài (Revised): 06/11/2023

Duyệt đăng (Accepted): 22/11/2023

Title: Safe transport, storage and PCR detection of *Streptococcus agalactiae* and *Vibrio parahaemolyticus* on FTA cards

Author(s): Nguyen Diem Thu*, Trương Nhật Nam, Lê Thị Kim Phượng and Đỗ Việt Phương

Affiliation(s): The Virbac Aquaculture Technology Center (VATC)

TÓM TẮT

Bệnh do vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* (SA) và *Vibrio parahaemolyticus* (VP) có thể gây thiệt hại kinh tế cao trong nuôi trồng thủy sản. Việc vận chuyển các mẫu bệnh nguy hiểm khi thu mẫu từ ao nuôi đến nơi xét nghiệm còn gặp nhiều khó khăn và tốn thời gian. Nghiên cứu này đánh giá khả năng an toàn sinh học hay khả năng bất hoạt và lưu giữ của SA và VP trên thẻ FTA. Để đánh giá khả năng bất hoạt vi khuẩn của thẻ FTA, tế bào vi khuẩn hoặc mô cá/tôm được tẩm lên thẻ và tăng sinh trong môi trường lỏng 24, 48, 72 giờ. Ngoài ra, DNA vi khuẩn SA và VP trên thẻ FTA được giữ ở 4°C trong 1,5-15 tháng, sau đó được phân tích bằng PCR. Kết quả cho thấy SA và VP đều bị bất hoạt sau khi lưu trữ trên thẻ FTA và PCR đã phát hiện thành công SA và VP sau 13-15 tháng lưu trữ. Nghiên cứu này cho thấy việc sử dụng thẻ FTA mang lại sự an toàn, đơn giản, dễ dàng trong vận chuyển, lưu trữ và phát hiện các mầm bệnh vi khuẩn bằng PCR.

Từ khóa: An toàn sinh học, lưu trữ DNA, thẻ FTA, PCR, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio parahaemolyticus*

ABSTRACT

Infections caused by *Streptococcus agalactiae* (SA) and *Vibrio parahaemolyticus* (VP) can cause high economic losses in aquaculture. Difficulty and time-consuming procedures were observed in transporting hazardous sample collection from farmed fish to the diagnosis laboratory. Effective methods for collecting, storing, and transporting fish and shrimp samples at the farms are needed worldwide for disease surveillance. This study investigated the biosafety or inactivation capacity and perseverance of SA and VP stored on Flinder Technology Associates (FTA) cards. To evaluate the bacteria inactivation capacity of FTA cards, bacteria cells or fish/shrimp tissues were impregnated on FTA cards and inoculated on broth media for 24 h, 48 h, and 72 h. In addition, bacterial DNA of SA and VP stored on FTA card at 4°C for 1.5-15 months was evaluated by PCR. The results showed that all tested bacteria were inactivated after storage on FTA cards and the PCR was successful detection of SA and VP after 13-15 months of storage. This study indicates the use of FTA cards provides a safe, simple collection, easy transfer, storage and PCR detection of bacterial pathogens.

Keywords: Biosafety, DNA stability, FTA card, PCR, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio parahaemolyticus*

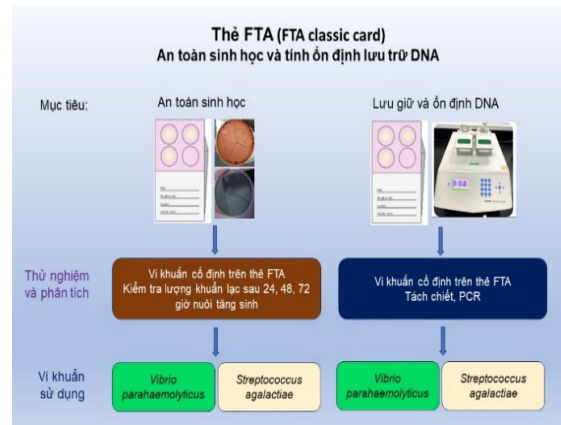
1. GIỚI THIỆU

Cá rô phi và tôm thẻ chân trắng là đối tượng nuôi thủy sản có tiềm năng lớn trong xuất khẩu và tiêu thụ nội địa tại Việt Nam. Năm 2020, Việt Nam đạt sản lượng cá rô phi 270.000 tấn (đứng thứ 7 trên thế giới) (FAO, 2020) và 632.300 tấn tôm thẻ chân trắng (VASEP, 2021). Tuy nhiên, nghề nuôi cá rô phi và tôm thẻ chân trắng còn gặp nhiều khó khăn do dịch bệnh vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* và *Vibrio parahaemolyticus*. *S. agalactiae* có tỷ lệ nhiễm cao (43%) trên cá rô phi với các biểu hiện bệnh lý như bỏ ăn, mắt đục/lồi, ổ bụng chứa nhiều dịch, ruột không có thức ăn, gan sưng huyết (Hạnh và ctv., 2020). Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (Tran et al., 2013) là bệnh nguy hiểm ở tôm nuôi gây nhiều thiệt hại cho người nuôi tôm do bệnh lây lan nhanh và tỷ lệ gây chết cao (Oanh & Phương, 2012).

Các phương pháp bảo quản các mẫu mô và DNA gồm đông lạnh, sấy khô và bảo quản trong ethanol hoặc dung dịch đậm (Michaud & Foran, 2011; Straube & Juen, 2013). Tuy nhiên, các phương pháp này có chi phí cao và còn nhiều khó khăn như khó giữ đông lạnh hoặc sấy khô các mẫu thu tại hiện trường, ethanol là chất dễ cháy cần đóng gói và vận chuyển cách chuyên biệt. Giấy lọc thông thường đã dùng lưu giữ DNA mẫu máu (ở nhiệt độ 20-25°C) nhưng không mang lại sự ổn định lâu dài cho DNA vì nó không bảo vệ chống lại sự biến tính của DNA (Panteloeff et al., 1999; Smith & Burgoyne, 2004). Do đó, việc tìm kiếm cách hiệu quả hơn trong việc lấy mẫu, vận chuyển, lưu trữ và phân lập vật liệu di truyền để phát hiện và xác định nhanh hơn các mầm bệnh vi khuẩn góp phần giảm công lao động và các phương pháp phân tích tiếp theo là điều rất cần thiết.

Thẻ FTA (Flinders Technology Associates) do Whatman sáng chế, là một phương pháp mới để thu thập, tinh chế và phân tích nhanh các vật liệu di truyền từ nhiều nguồn sinh học như máu toàn phần, tế bào miệng, mô, plasmid, tinh trùng, vật liệu thực vật và vi sinh vật (Abosrer et al., 2022; Hide et al., 2003; Lampel et al., 2004; Rogers & Burgoyne, 1997; Serra et al., 2018). Thẻ FTA được xử lý bằng tấm hỗn hợp hóa chất độc quyền chứa chất đệm mạnh, bẫy gốc tự do và chất biến tính protein giúp phân giải màng tế bào khi tiếp xúc, giữ lại DNA, đồng thời ổn định và bảo vệ DNA khỏi nuclease, quá trình oxy hóa, tổn hại do tia cực tím và sự phân hủy do vi khuẩn và nấm (Fujita & Kubo, 2006; Smith & Burgoyne, 2004). Thẻ FTA đã được sử dụng thành công trong việc thu thập mẫu máu trên người để phân tích trong pháp y, truyền máu và phát hiện các

bệnh lây truyền qua đường máu (Abosrer et al., 2022; Becker et al., 2004). Trong thủy sản, thẻ FTA đã được sử dụng trong xác định tác nhân gây bệnh trên mô cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*) như vi khuẩn *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Lactococcus garvieae*, and *Vagococcus salmoninarum* (Çağatay, 2022). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu/công bố nào tại Việt Nam về công dụng của thẻ FTA trong phát hiện mầm bệnh vi khuẩn *S. agalactiae* và *V. parahaemolyticus* trên mô cá tôm nuôi. Do đó, mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định khả năng bắt hoạt vi khuẩn *S. agalactiae* và *V. parahaemolyticus*, khả năng lưu giữ và thu hồi DNA trên thẻ theo thời gian trong phát hiện mầm bệnh bằng phương pháp PCR (Hình 1).



Hình 1. Tổng quan các bước thử nghiệm về thẻ FTA trong nghiên cứu

(Nguồn: hiệu chỉnh từ Krambrich et al., 2022)

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vi khuẩn và điều kiện nuôi

Hai chủng vi khuẩn *S. agalactiae* III (VB14-39T, được phân lập từ thận cá điêu hồng nuôi bè tại Đồng Tháp năm 2022) và *V. parahaemolyticus* (VB21015, được phân lập từ gan tụy tôm nuôi tại Bạc Liêu năm 2019) được sử dụng để đánh giá độ an toàn sinh học và khả năng lưu giữ DNA của thẻ FTA. Những chủng vi khuẩn phân lập này đã được định danh bằng phương pháp PCR (Imperi et al., 2010; Mai-Hoang et al., 2021) và giải trình tự RNA ribosome 16S bởi công ty Nam Khoa.

Vi khuẩn *S. agalactiae* được chuẩn bị theo quy trình của Nguyen et al. (2022). *S. agalactiae* được nuôi cấy trên môi trường thạch máu (Blood agar, Sigma-Aldrich, India) bổ sung 5% máy cừu ở 30°C trong 24 giờ, và các khuẩn lạc được hòa tan trong nước muối 0,85% vô trùng và được điều chỉnh mật độ vi khuẩn tương đương 10^9 CFU/mL (đo OD₆₀₀ ~

0,5 bằng máy đo quang phổ (SP-UV 500DB, Germany).

Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được nuôi tăng sinh với một số điều chỉnh theo quy trình của Nguyen and Vo (2019). *V. parahaemolyticus* được phục hồi trên đĩa thạch TCBS Agar (Merck, Đức) ở 30°C trong 24 giờ. Tiếp đó, một khuẩn lạc được chuyển sang môi trường Brain Heart Infusion Broth (BHIB, Himedia, Ấn Độ) (bổ sung 1,5% NaCl) nuôi lắc với 150 vòng/phút ở 30°C trong 16-18 giờ cho đến khi độ hấp thụ ở bước sóng 600 nm của dịch vi khuẩn gốc đạt khoảng 0,7 (tương đương 10^9 CFU/mL), độ hấp thụ được đo bằng máy đo quang phổ.

Sau đó, hai huyền dịch vi khuẩn trên được pha loãng ở hai nồng độ, nồng độ cao (pha loãng 10 lần) và nồng độ thấp (pha loãng 1.000 lần) bằng nước muối (0,85% NaCl cho vi khuẩn *S. agalactiae*, 2% NaCl cho vi khuẩn *V. parahaemolyticus*) và hai nồng độ này được đưa lên thẻ FTA card. Nồng độ thực tế của từng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhỏ giọt và đếm trên đĩa thạch máu (BA) cho vi khuẩn *S. agalactiae* và đĩa thạch TCBS cho vi khuẩn *V. parahaemolyticus* sau 24-48 giờ ủ đĩa ở nhiệt độ 30°C.

2.2. Thẻ FTA và giấy lọc định tính

Thẻ FTA bốn vị trí (QIAcard FTA Classic) (Qiagen, Đức) và giấy lọc định tính (Double Ring, Trung Quốc) vô trùng, được cắt cỡ nhỏ khoảng 2 cm², được sử dụng để lưu mẫu dịch vi khuẩn thuần và mô cá tôm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* và *V. parahaemolyticus*.

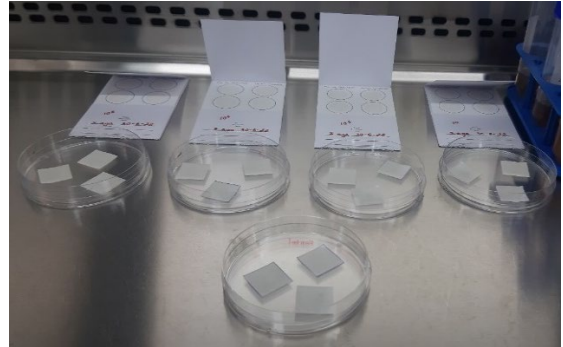
2.3. Mẫu mô cá và mô tôm

Mẫu mô cá tôm sử dụng được thu từ cá tôm chết sau gây nhiễm với *S. agalactiae* cho cá và *V. parahaemolyticus* cho tôm. Cá rô phi (*Oreochromis niloticus*), trọng lượng $43,8 \pm 4,5$ g/con được gây nhiễm bằng phương pháp tiêm dịch vi khuẩn *S. agalactiae* vào xoang bụng với liều $1,7 \times 10^6$ CFU/mL. Tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), trọng lượng $4,0 \pm 1,0$ g/con được gây nhiễm bằng phương pháp ngâm dịch vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với liều $4,6 \times 10^7$ CFU/mL trong một giờ. Tổng 6 mẫu cá tôm (3 mẫu cá và 3 mẫu tôm) được thu mẫu mô thận của cá và gan tụy của tôm chết sau gây nhiễm để lưu mẫu trên thẻ FTA.

2.4. Phương pháp đưa mẫu dịch vi khuẩn và mẫu mô cá tôm lên thẻ FTA

2.4.1. Đối với dịch vi khuẩn

Hai nồng độ vi khuẩn đã pha loãng 10 lần ($\sim 10^8$ CFU/mL) và 1.000 lần ($\sim 10^6$ CFU/mL) từ dịch vi khuẩn gốc (như hướng dẫn trên) được sử dụng đưa lên thẻ FTA và giấy lọc (đối chứng dương). Huyền phù vi khuẩn (50 μ L) được nhỏ ở mỗi nồng độ thử nghiệm vào các vị trí/vòng tròn riêng lẻ trên thẻ FTA và giấy lọc (3 mảnh/nồng độ) (Hình 1). Tương tự, 50 μ L môi trường BHIB (không chứa vi khuẩn) được đưa lên thẻ FTA và giấy lọc làm đối chứng âm. Tất cả các thẻ mẫu FTA và giấy lọc được để khô ít nhất 30 phút ở nhiệt độ phòng cho đến khi thẻ được khô hoàn toàn tại các vị trí có dịch vi khuẩn và sau đó bảo quản trong túi nhựa kín trong phòng thí nghiệm cho quá trình phân tích tiếp theo.



Hình 2. Thẻ FTA và giấy lọc với dịch vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

2.4.2. Đối với mô cá tôm

Mẫu gan tụy tôm hoặc mẫu thận cá chết (0,1 g) sau khi gây nhiễm (3 mẫu tôm và 3 mẫu cá) đặt vào vòng tròn của thẻ FTA, ấn nhẹ và trải đều mẫu mô lên vị trí thẻ FTA/giấy lọc. Tương tự, 0,1 g mẫu gan tụy tôm hoặc mẫu thận cá sạch bệnh hay không có sự hiện diện của vi khuẩn *S. agalactiae* hoặc *V. parahaemolyticus* cũng được đưa lên thẻ FTA để làm đối chứng âm. Tất cả các thẻ mẫu FTA và giấy lọc được để khô ít nhất 30 phút ở nhiệt độ phòng cho đến khi khô hoàn toàn tại các vị trí có mẫu mô cá tôm và sau đó bảo quản trong túi nhựa kín cho quá trình phân tích tiếp theo.

2.5. Xác định an toàn sinh học/khả năng bất hoạt vi khuẩn của thẻ FTA

Để đánh giá khả năng bất hoạt vi khuẩn trên thẻ FTA, sau khi đưa 50 μ L dịch vi khuẩn thuần hoặc 0,1g mẫu mô cá tôm có mang vi khuẩn *S. agalactiae*

và *V. parahaemolyticus* trên các vị trí chứa mẫu (vòng tròn) trên thẻ FTA và giấy lọc, thẻ được để khô hoàn toàn (sau 0,5-3 giờ). Sau đó, các vị trí phần thẻ FTA này và giấy lọc được cắt khoảng 0,25 cm² và cho vào ống falcon 50 mL chứa 10 mL môi trường BHIB (0,85% NaCl cho *S. agalactiae* hoặc 2% NaCl cho *V. parahaemolyticus*), nuôi lắc với tốc độ 150 vòng/phút ở 30°C. Lượng khuẩn lạc trong dịch nuôi cấy vào các thời điểm 24 giờ, 48 giờ, và 72 giờ được theo dõi bằng phương pháp trải đếm trên môi trường đĩa thạch TCBS (*V. parahaemolyticus*) hoặc BA (*S. agalactiae*).

2.6. Khả năng lưu giữ và thu hồi DNA vi khuẩn của thẻ FTA

Để đánh giá tính ổn định của DNA vi khuẩn lưu giữ trên thẻ FTA, các vị trí/vòng tròn lưu mẫu trên thẻ FTA gồm mẫu dịch vi khuẩn thuần (n=4) hoặc mô cá tôm (n=6) nhiễm của hai loại vi khuẩn *S. agalactiae* và *V. parahaemolyticus* sau khi được để khô, thẻ FTA được giữ trong túi zip và bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong 3, 5 và 13 tháng (*V. parahaemolyticus*, n=5) và 1,5, 13 và 15 tháng (*S. agalactiae*, n=5). Tại các thời điểm này, DNA được tách chiết từ thẻ FTA, DNA chiết tách được bảo

quản ở -20°C cho phân tích sinh học phân tử (PCR) tiếp theo.

2.7. Tách chiết DNA và định danh vi khuẩn cho thẻ FTA

Sau 1,5, 3, 5, 13 và 15 tháng lưu trữ, cắt 0,25 cm² phần vị trí lưu mẫu có chứa dịch vi khuẩn thuần hoặc mô cá tôm nhiễm *S. agalactiae* và *V. parahaemolyticus* trên thẻ FTA, được tách chiết DNA bằng kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, USA) theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Khuẩn lạc vi khuẩn *S. agalactiae* và *V. parahaemolyticus* được phân lập từ cá tôm cũng được tách chiết theo kit trên để làm mẫu đối chứng dương. Các mẫu tách chiết được đo hàm lượng DNA bằng máy đo Nanodrop (Maestrogen). Thực hiện PCR với các cặp mồi cho *S. agalactiae* và *V. parahaemolyticus* theo Bảng 1 (Imperi et al., 2010; Mai-Hoang et al., 2021). Theo Mai-Hoang et al. (2021), cặp mồi GMIF1-2 được thiết kế dựa trên trình tự của gen *toxA* và *toxB* từ chủng *Vibrio parahaemolyticus* (KM067908.1 trên GenBank) mang plasmid pVA-1. Cặp mồi này khuếch đại toàn bộ gen *toxA*, 12 nucleotide giữa hai gen và một phần gen *toxB*, do đó có thể phát hiện cả gen *toxA* bình thường (366 bp) và gen đột biến (1.429 bp).

Bảng 1. Các mồi sử dụng thực hiện PCR cho các chủng *Streptococcus agalactiae* và *Vibrio parahaemolyticus*

Chủng vi khuẩn	Gen đích	Mồi	Nucleotide (5' → 3')	Sản phẩm (bp)
<i>S. agalactiae</i> III ⁽¹⁾	<i>cpsG</i>	<i>cpsG</i> -F	ACATGAACAGCAGTTCAACCGT	352
		<i>cpsG</i> -2-3-6-RT	CCATCTACATCTTCAATCCAAGC	
	<i>cpsL</i>	<i>cpsL</i> -F	CAATCCTAAGTATTTTCGGTTCATT	688
<i>cpsL</i> -R		TAGGAACATGTTTCATTAACATAGC		
<i>V. parahaemolyticus</i> ⁽²⁾	<i>toxA</i> , <i>toxB</i>	GMIF1-F	TTCTCACGATTGGACTGTCTG	366
		GMIF2-R	GGGTAAATTCCGTCAAAGATG	1.429

Ghi chú: ⁽¹⁾Imperi et al. (2010); ⁽²⁾Mai-Hoang et al. (2021)

Phương pháp PCR xác định *S. agalactiae* được thực hiện với hỗn hợp phản ứng 25 µL bao gồm 12,5 µL 2X PCR BIO Taq Mix Red (PCR Biosystems, Anh), 1,0 µL 10 pmol của mỗi mồi oligonucleotide, 5,0 µL 20 ng gDNA và 3,5 µL nước. DNA của *S. agalactiae* III và nước (không có nuclease, Sigma-Aldrich, UK) được sử dụng làm đối chứng dương và đối chứng âm. Quá trình khuếch đại PCR được thực hiện trên máy PCR S1000 (Bio-Rad) theo thông số chu trình nhiệt của Imperi et al. (2010), với 1 chu kỳ 5 phút ở 95°C; 15 chu kỳ 60 giây ở 95°C, 60 giây ở 54°C và 2 phút ở 72°C; 25 chu kỳ 60 giây ở 95°C, 60 giây ở 56°C và 2 phút ở 72°C; và chu kỳ cuối là 10 phút ở 72°C.

Đối với *V. parahaemolyticus*, PCR được thực hiện với hỗn hợp phản ứng 25 µL bao gồm 12,5 µL 2X PCR BIO Taq Mix Red (PCR Biosystems, Anh), 0,75 µL 10 pmol của mỗi mồi oligonucleotide, 4,0 µL 20 ng gDNA và 7,0 µL nước. DNA của *V. parahaemolyticus* và nước (không có nuclease, Sigma-Aldrich, UK) được sử dụng làm đối chứng dương và đối chứng âm. Quá trình khuếch đại PCR được thực hiện trên máy PCR S1000 (Bio-Rad) theo thông số chu trình nhiệt của Mai-Hoang et al. (2021), với 1 chu kỳ 5 phút ở 95°C; 30 chu kỳ 30 giây ở 95°C, 30 giây ở 60°C và 15 giây ở 72°C; và chu kỳ cuối là 5 phút ở 72°C.

Các sản phẩm PCR (352 bp và 688 bp của *S. agalactiae* III, 366 bp và/hoặc 1429 bp của *V.*

parahaemolyticus) cùng thang chuẩn (100 bp DNA Ladder; Promega, USA) được điện di đồng thời trong gel agarose 1,0% với thuốc nhuộm RedSafe™ (iNtRON Biotechnology) và đọc kết quả qua máy đọc gel UVP Plus (Analytik Jena, Mỹ).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng bất hoạt vi khuẩn của thẻ FTA lưu giữ dịch vi khuẩn thuần và mô cá tôm

Đối với dịch vi khuẩn thuần đã đưa vào thẻ FTA, kết quả trải đếm đĩa sau 24, 48 và 72 giờ tăng sinh hai loại vi khuẩn *S. agalactiae* và *V. parahaemolyticus* cả hai nồng độ thử nghiệm (~10⁶ và ~10⁸ CFU/mL) đều cho thấy không còn sự hiện

diện của vi khuẩn (dịch vi khuẩn sống) đã đưa vào các vị trí lưu mẫu trên thẻ FTA (Bảng 2). Trong khi đó vẫn có sự hiện diện của vi khuẩn *S. agalactiae* hoặc *V. parahaemolyticus* trên các mẫu giấy lọc đã nhỏ dịch vi khuẩn. Không có sự hiện diện của vi khuẩn trên phần thẻ FTA và giấy lọc trên mẫu đối chứng âm ở cả hai nồng độ vi khuẩn (Bảng 2). Kết quả nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu trước, Rajendram et al. (2006) cho thấy các loại vi khuẩn (~ 100 mẫu) đưa lên thẻ FTA ở nồng độ cao 10⁷-10⁸ CFU/mL đều bị bất hoạt. Stringer et al. (2021) cũng xác nhận thẻ FTA có hiệu quả bất hoạt vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* từ môi trường dịch nuôi cấy thuần và các mẫu phổi mang vi khuẩn.

Bảng 2. Trung bình mật độ vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và *S. agalactiae* trên thẻ FTA và giấy lọc đã có dịch vi khuẩn sau 24, 48 và 72 giờ tăng sinh trên môi trường lỏng (n=3)

Thí nghiệm	Trung bình mật độ vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> và <i>S. agalactiae</i> (CFU/mL)					
	24h		48h		72h	
	Thẻ FTA	Giấy lọc	Thẻ FTA	Giấy lọc	Thẻ FTA	Giấy lọc
V1	0	8,4 x 10 ⁸	0	6,8 x 10 ⁸	0	7,0 x 10 ⁸
V2	0	7,8 x 10 ⁸	0	6,8 x 10 ⁸	0	3,1 x 10 ⁸
S1	0	> 10 ⁷	0	5,4 x 10 ⁷	0	4,1 x 10 ⁷
S2	0	> 10 ⁷	0	8,1 x 10 ⁷	0	6,6 x 10 ⁷
ĐC	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: V1= *V. parahaemolyticus* mẫu 1; V2= *V. parahaemolyticus* mẫu 2; S1 = *S. agalactiae* mẫu 1; S2= *S. agalactiae* mẫu 2; ĐC = Đối chứng âm/môi trường lỏng BHIB. Mật độ vi khuẩn đưa lên thẻ 9,6 x 10⁵ và 9,6 x 10⁷ CFU/mL (*V. parahaemolyticus*); 9,4 x 10⁵ và 9,4 x 10⁷ CFU/mL (*S. agalactiae*)

Đối với mô cá tôm nhiễm vi khuẩn đã được cho thẻ lên FTA, kết quả cho thấy có sự tương đồng với thử nghiệm trên dịch vi khuẩn thuần. Kết quả trải đếm đĩa sau 24, 48 và 72 giờ tăng sinh các mẫu mô thận cá nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* (FS1, FS2, FS3) và mô gan tụy tôm nhiễm *V. parahaemolyticus* (SV1, SV2, SV3) đều cho thấy không còn sự hiện diện của vi khuẩn trong các mẫu mô cá tôm đã lưu giữ trên thẻ FTA. Trong khi đó vẫn có sự hiện diện của vi khuẩn trong mô cá tôm nhiễm *S. agalactiae* hoặc *V. parahaemolyticus* trên các mẫu giấy lọc. Không có sự hiện diện của vi khuẩn *S. agalactiae* hoặc *V. parahaemolyticus* trên phần thẻ FTA và giấy lọc của mẫu đối chứng âm/mô tôm cá sạch trên tất cả các mẫu (Bảng 3).

Đặc tính bất hoạt vi khuẩn của thẻ FTA được thử nghiệm ở mật độ tế bào khá cao (~10⁸ CFU/mL) đã chứng minh rằng tất cả các vi sinh vật được lưu trữ trên FTA trong nghiên cứu này đều không thể sống được. Dung dịch đệm ly giải có chứa chất biến tính guanidine isothiocyanate đã được chứng minh là có hiệu quả cao trong việc vô hiệu hóa các tế bào mà không ảnh hưởng đến chất lượng của axit nucleic

(Rajendram et al., 2006). Kết quả nghiên cứu này cho thấy thẻ FTA có khả năng bất hoạt khuẩn *S. agalactiae* hoặc *V. parahaemolyticus* khi tế bào vi khuẩn sống được đưa trực tiếp lên thẻ hoặc đưa qua mẫu mô cá tôm có nhiễm vi khuẩn này lên thẻ, trong cả hai trường hợp trên thẻ FTA đều bất hoạt được vi khuẩn.

Bảo quản và lưu trữ mẫu là cần thiết để tiến hành các nghiên cứu về DNA vi khuẩn, sẽ là thách thức khi nghiên cứu được tiến hành ở thực địa vùng nhiệt đới/khí hậu nóng. Các nghiên cứu trước cho thấy thẻ FTA đã được dùng để vận chuyển các mẫu lâm sàng và mẫu thực địa nhằm phát hiện vi khuẩn hay mầm bệnh bằng phương pháp sinh học phân tử của nhiều loại vi khuẩn khác nhau, bao gồm *Aeromonas hydrophila*, *V. parahaemolyticus*, *S. agalactiae*, *Mycobacterium chelonae* (Rajendram et al., 2006). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định tính an toàn và khả năng lưu trữ DNA vi khuẩn gây bệnh trên cá tôm là *S. agalactiae* hoặc *V. parahaemolyticus* trên thẻ FTA và nhận thấy rằng thẻ này an toàn để sử dụng cho hai loại vi khuẩn đã được thử nghiệm.

Bảng 3. Trung bình mật độ *V. parahaemolyticus* và *S. agalactiae* trên thẻ FTA và giấy lọc đã có mô cá tôm nhiễm khuẩn sau 24, 48 và 72 giờ tăng sinh trên môi trường lỏng (n=3)

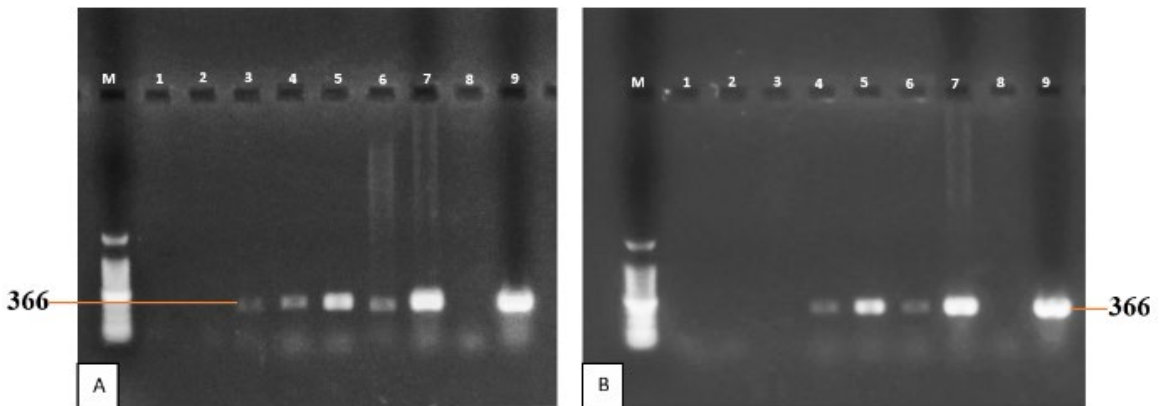
Nghiệm thức	Trung bình mật độ vi khuẩn <i>V. parahaemolyticus</i> và <i>S. agalactiae</i> (CFU/mL)					
	24h		48h		72h	
	Thẻ FTA	Giấy lọc	Thẻ FTA	Giấy lọc	Thẻ FTA	Giấy lọc
SV1	0	2,2 x 10 ⁹	0	2,9 x 10 ⁹	0	4,5 x 10 ⁹
SV2	0	8,8 x 10 ⁸	0	2,5 x 10 ⁹	0	5,1 x 10 ⁸
SV3	0	3,1 x 10 ⁸	0	1,7 x 10 ⁹	0	5,4 x 10 ⁹
ĐCS	0	0	0	0	0	0
FS1	0	6,0 x 10 ⁶	0	2,0 x 10 ⁸	0	6,7 x 10 ⁷
FS2	0	9,6 x 10 ⁸	0	1,1 x 10 ⁹	0	1,0 x 10 ⁹
FS3	0	5,3 x 10 ⁸	0	5,5 x 10 ⁸	0	2,9 x 10 ⁸
ĐCF	0	0	0	0	0	0

Ghi chú: SV= Gan tụy tôm nhiễm *V. parahaemolyticus* với liều gây nhiễm 6,0 x 10⁷ CFU/ml; FS = Thận cá nhiễm *S. agalactiae* với liều gây nhiễm 1,2 x 10⁶ CFU/cá; ĐCS = đối chứng âm/tôm/mẫu tôm sạch/không nhiễm *V. parahaemolyticus*; ĐCF = đối chứng âm/mẫu cá sạch/không nhiễm *S. agalactiae*.

3.2. Khả năng lưu giữ và độ ổn định DNA vi khuẩn của thẻ FTA

Đối với các mẫu thẻ FTA đã đưa vi khuẩn *V. parahaemolyticus* lên thẻ, cả 5/5 mẫu của vi khuẩn thuần và gan tụy tôm đều khuếch đại và phát hiện gen mục tiêu (366 bp) của vi khuẩn này sau 3 tháng lưu giữ thẻ ở 4°C (Hình 3A). Tuy nhiên, sau 5 tháng và 13 tháng lưu giữ, chỉ có 4/5 mẫu khuếch đại và phát hiện gen mục tiêu của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (Hình 3B). Mẫu dịch vi khuẩn ở nồng độ thấp (9,6 x 10⁵ CFU/mL, V1) không phát

hiện vạch sản phẩm PCR, nhưng có vạch sản phẩm PCR ở mẫu dịch vi khuẩn nồng độ cao hơn (9,6 x 10⁷ CFU/mL, V2). Nồng độ DNA (tỉ lệ 260/280) mẫu V1, V2, SV1, SV2, SV3 sau 13 tháng lưu giữ lần lượt là 1,78 ng/μL (1,87), 19,52 ng/μL (1,95), 16,42 ng/μL (1,91), 61,83 ng/μL (1,81), 57,09 ng/μL (1,81). Điều này cho thấy có thể do hàm lượng DNA trong mẫu V1 thấp sau khi tách chiết (có thể do vi khuẩn không trải đều trên thẻ FTA, phần thẻ đã cắt có ít vi khuẩn), không đủ lượng để khuếch đại sản phẩm gen mục tiêu nên có thể vạch bị mờ, không thấy được trên gel.



Hình 3. Kết quả PCR xác định *V. parahaemolyticus* (với môi GMIF1–2) của thẻ FTA lưu trữ sau 3 tháng (A) và 5 tháng (B)

(M): Thang chuẩn 100 bp; (1-2): trống; (3-4): mẫu V1, V2 (dịch vi khuẩn); (5-7): mẫu SV1, SV2, SV3 (gan tụy tôm); (8): đối chứng âm; (9): Đối chứng dương (*V. parahaemolyticus*)

Đối với các mẫu thẻ FTA đã đưa vi khuẩn *S. agalactiae* lên thẻ, 3/3 mẫu mô thận cá và 2/2 mẫu dịch vi khuẩn thuần đều khuếch đại và phát hiện hai gen mục tiêu *cpsG* (352 bp) và *cpsL* (688 bp) của vi khuẩn này sau 1,5 tháng, 13 tháng và 15 tháng lưu giữ thẻ ở 4°C (Hình 4). Hàm lượng DNA và chất

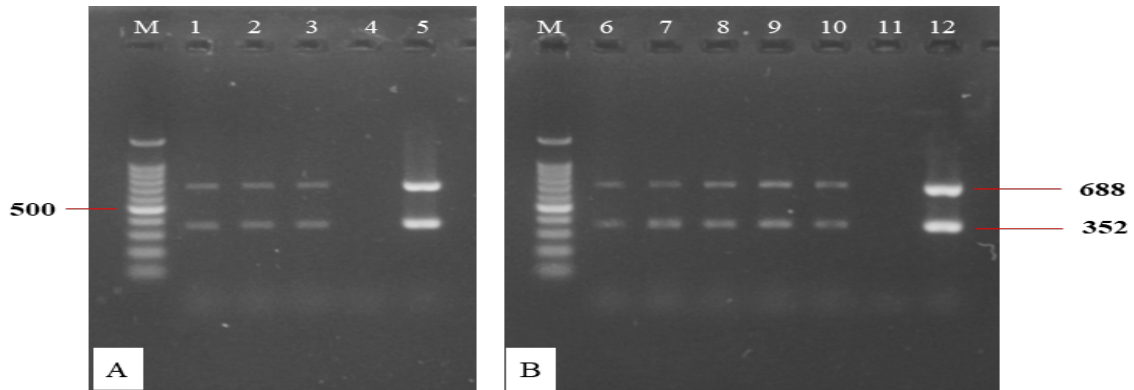
lượng DNA của các mẫu với tỉ lệ A260/A280 cho thấy chất lượng DNA tốt (Bảng 4). Kết quả cho thấy thẻ FTA card có khả năng lưu giữ vi khuẩn *S. agalactiae* trên thẻ trong thời gian dài (15 tháng).

Karthikeyan et al. (2020) đã cho thấy khả năng lưu giữ và sự ổn định DNA của vi bào tử trùng EHP (*Enterocytozoon hepatopenaei*) trên thẻ FTA sau 6 tháng ở nhiệt độ phòng. Rajendram et al. (2006) đã công bố sau ba năm lưu giữ thẻ FTA ở nhiệt độ phòng, sản phẩm khuếch đại PCR đoạn 1000 bp của gen 16S rDNA đạt được 100/100 chủng và không có sự tạp nhiễm giữa các chủng vi khuẩn nghiên cứu qua kết quả giải trình tự DNA. Điều này minh chứng rõ ràng rằng DNA của vi khuẩn vẫn ổn định sau 3 năm lưu giữ trên thẻ FTA. Mặt khác, sử dụng FTA rẻ tiền, nhanh chóng và hiệu quả trong vận chuyển DNA vi khuẩn (Serra et al., 2018). Những kết quả này đã chứng minh rõ ràng tính hữu ích của thẻ FTA như một phương tiện lý tưởng để lưu trữ và thu hồi nhanh chóng DNA của vi khuẩn cho các ứng dụng phân tích sinh học phân tử dựa trên PCR.

Bảng 4. Hàm lượng DNA các mẫu dịch vi khuẩn và mô cá nhiễm *Streptococcus agalactiae*

Nghiệm thức	DNA (ng/μL)	260/280
FS1-1,5 tháng	28,18	1,97
FS2-1,5 tháng	8,77	1,87
FS3-1,5 tháng	21,7	1,86
FS1-13 tháng	11,44	1,98
FS2-13 tháng	2,38	1,98
FS3-13 tháng	6,49	1,85
S1-15 tháng	0,14	1,83
S2-15 tháng	0,80	1,94

Ghi chú: FS = Mô thận cá nhiễm *S. agalactiae*; S = mẫu chứa dịch vi khuẩn *S. agalactiae*



Hình 4. Kết quả PCR xác định *S. agalactiae* của thẻ FTA lưu trữ sau 1,5 tháng (A) và 13-15 tháng (B)

(M): Thang chuẩn 100 bp; (1-3): mẫu SF1, SF2, SF3 (thận cá 1.5 tháng); (6,7): mẫu S1, S2 (dịch vi khuẩn 15 tháng); (8-10): mẫu SF1, SF2, SF3 (thận cá 13 tháng); (4, 11): đối chứng âm; (5, 12): Đối chứng dương (*S. agalactiae*)

4. KẾT LUẬN

Sự bất hoạt vi khuẩn *S. agalactiae* và *V. parahaemolyticus* trên thẻ FTA khi cố định dịch vi khuẩn và mô cá tôm bệnh cho thấy thẻ FTA an toàn trong vận chuyển. Mặt khác, DNA vi khuẩn trên thẻ FTA được lưu giữ lâu dài và ổn định đến 15 tháng và đã thành công trong khuếch đại và phát hiện gen mục tiêu của hai loài vi khuẩn gây bệnh trên cá tôm bằng phương pháp PCR, cho thấy khả năng lưu giữ và độ ổn định của DNA trên thẻ FTA. Kết quả

nghiên cứu này là báo cáo đầu tiên tại Việt Nam về ứng dụng của FTA đối với hai vi khuẩn *S. agalactiae* và *V. parahaemolyticus*, thẻ có thể được sử dụng một cách an toàn và hiệu quả để thu thập, lưu trữ, vận chuyển và phân tích các loại vi khuẩn, tạo điều kiện thuận lợi cho việc vận chuyển các mẫu sinh học trong tương lai, phục vụ phát triển ngành thủy sản. Nghiên cứu tiếp theo về sự ảnh hưởng của các loại chủng vi khuẩn, nồng độ, giống loài và điều kiện môi trường khác nhau của thẻ FTA cần được khảo sát thêm trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Altinok, İ., & Kurt, İ. (2003). Molecular diagnosis of fish diseases: a review. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 3(2).
- Abosrer, F., Pezzoni, G., Brocchi, E., Castelli, A., Baselli, S., Grazioli, S., Madani, H., Kraim, E., Dayhum, A., & Eldaghayes, I. (2022). FTA Cards as a Rapid Tool for Collection and Transport of Infective Samples: Experience with Foot-and-Mouth Disease Virus in Libya. *Animals*, 12(22), 3198. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani12223198>
- Becker, S., Franco, J. R., Simarro, P. P., Stich, A., Abel, P. M., & Steverding, D. (2004). Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. *Diagnostic Microbiology*

- and Infectious Disease*, 50(3), 193-199.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.07.001>
- Çağatay, I. T. (2022). FTA® card tool for sampling and rapid diagnosis of bacterial diseases from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissue. *Aquaculture International*, 1-10.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10499-021-00810-6>
- FAO. (2020). International Technical Seminar on Tilapia Health: 1 - 3 December 2021
- Fujita, Y., & Kubo, S. (2006). Application of FTA® technology to extraction of sperm DNA from mixed body fluids containing semen. *Legal Medicine*, 8(1), 43-47.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2005.06.007>
- Hạnh, T. T. M., Hạnh, N. T., Nghĩa, N. H., Nhật, P. H., Hải, L. M., Vinh, T. T. T., & Vân, P. T. (2020). Một số đặc điểm chính của *Streptococcus agalactiae* gây bệnh ở cá rô phi (*Oreochromis sp.*) nuôi trong nước lợ. *Tạp chí Nông nghiệp & PTNT (MARD Journal Article)*, 12, 73-79.
- Hide, G., Hughes, J. M., & McNuff, R. (2003). A rapid and simple method of detection of *Blepharisma japonicum* using PCR and immobilisation on FTA paper. *BMC ecology*, 3(1), 1-7.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1472-6785-3-7>
- Imperi, M., Pataracchia, M., Alfarone, G., Baldassarri, L., Orefici, G., & Creti, R. (2010). A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. *Journal of microbiological methods*, 80(2), 212-214.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.010>
- Karthikeyan, K., Saranya, R., Bharath, R., Vidya, R., Itami, T., & Sudhakaran, R. (2020). A simple filter paper-based method for transporting and storing *Enterocytozoon hepatopenaei* DNA from infected *Litopenaeus vannamei* tissues. *Journal of Invertebrate Pathology*, 169, 107305.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107305>
- Lampel, K. A., Dyer, D., Kornegay, L., & Orlandi, P. A. (2004). Detection of *Bacillus* spores using PCR and FTA filters. *Journal of Food Protection*, 67(5), 1036-1038.
<https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.5.1036>
- Mai-Hoang, T. D., Tien, H. L., Chau-Hoang, H. M., Nguyen-Phuoc, K. H., Pham, H. Q., Tran, T. L., & Tran-Van, H. (2021). A novel PCR method for simultaneously detecting Acute hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and mutant-AHPND in shrimp. *Aquaculture*, 534, 736336.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736336>
- Michaud, C. L., & Foran, D. R. (2011). Simplified field preservation of tissues for subsequent DNA analyses. *Journal of Forensic Sciences*, 56(4), 846-852.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01771.x>
- Nguyen, T. T. T., & Vo, T. T. B. (2019). Đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ chân trắng, *Penaeus vannamei*, cảm nhiễm bởi vi khuẩn gây hoại tử gan tụy cấp *Vibrio parahaemolyticus*. *The Journal of Agriculture and Development*, 18(1), 80-88.
<https://doi.org/10.52997/jad.10.01.2019>
- Nguyen, D. T., Marancik, D., & Soto, E. (2020). Intracoelemic-and intramuscular-injection challenge model of piscine Streptococcosis in white sturgeon fingerlings. *Journal of Aquatic Animal Health*, 32(3), 133-138.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/aah.10112>
- Oanh, Đ. T. H., & Phương, N. T. (2012). Các bệnh nguy hiểm trên tôm nuôi ở đồng bằng sông Cửu long. *Tạp chí Khoa học Đại học cần Thơ*, (22c), 106-118.
- Panteleeff, D. D., John, G., Nduati, R., Mbori-Ngacha, D., Richardson, B., Kreiss, J., & Overbaugh, J. (1999). Rapid method for screening dried blood samples on filter paper for human immunodeficiency virus type 1 DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(2), 350-353.
<https://doi.org/10.1128/jcm.37.2.350-353.1999>
- Rajendram, D., Ayenza, R., Holder, F., Moran, B., Long, T., & Shah, H. (2006). Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. *Journal of microbiological methods*, 67(3), 582-592.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.010>
- Rogers, C., & Burgoyne, L. (1997). Bacterial typing: storing and processing of stabilized reference bacteria for polymerase chain reaction without preparing DNA-an example of an automatable procedure. *Analytical biochemistry*, 247(2), 223-227.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1997.2031>
- Serra, O., Frazzi, R., Perotti, A., Barusi, L., & Buschini, A. (2018). Use of FTA® classic cards for epigenetic analysis of sperm DNA. *BioTechniques*, 64(2), 45-51.
<https://doi.org/https://doi.org/10.2144/btn-2017-0101>
- Smith, L., & Burgoyne, L. A. (2004). Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper. *BMC ecology*, 4(1), 1-11.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1472-6785-4-4>
- Straube, D., & Juen, A. (2013). Storage and shipping of tissue samples for DNA analyses: A case study on earthworms. *European Journal of Soil Biology*, 57, 13-18.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.04.001>
- Stringer, O. W., Bossé, J. T., Lacouture, S., Gottschalk, M., Fodor, L., Angen, Ø., Velazquez, E., Penny, P., Lei, L., & Langford, P. R. (2021). Rapid detection and typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars directly from clinical samples: Combining FTA® card technology with multiplex PCR. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 728660.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fvets.2021.728660>
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohnney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 105(1), 45-55.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3354/dao02621>
- VASEP. (2021). *Tổng quan ngành thủy sản Việt Nam*. <http://vasep.com.vn/gioi-thieu/tong-quan-nganh>