

**TẦN SỐ XUẤT HIỆN *VIBRIO CHOLERA*E TRÊN TÔM VÀ NHUYỄN THÊ,
XÁC ĐỊNH SEROGROUP O1, O139 VÀ BIOTYPE CỦA *V. CHOLERA*E
BẰNG KỸ THUẬT Multiplex-PCR**

Nguyễn Thị Xuân Trang và Nguyễn Ngọc Tuấn
Khoa Chăn nuôi Thú y, Đại học Nông Lâm TP. HCM
TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện trên 240 mẫu tôm và nhuyễn thể thu thập ở Đồng Nai, TP. Hồ Chí Minh. Mẫu được tăng sinh bằng hai dung dịch muối pepton kiềm không bổ sung và bổ sung polymycin B 50 UI và 3 % NaCl. DNA ly trích trực tiếp từ dung dịch tăng sinh được kiểm tra bằng 3 phản ứng m-PCR để xác định (i) loài *V. cholerae* (m-PCR1); (ii) serogroup O1, O139 (m-PCR2) và (iii) biotype (m-PCR3). Bên cạnh đó, các gốc vi khuẩn cũng định danh bằng phương pháp sinh hóa và xác định lại bằng các phản ứng m-PCR.

Phản ứng m-PCR1 phát hiện *V. cholerae* trên 44,2% số mẫu ở môi trường 1 và 45,8% số mẫu ở môi trường 2. Trong khi đó, phương pháp sinh hóa chỉ phát hiện *V. cholerae* ở hai môi trường lần lượt là 41,3% và 10,0%.

Phản ứng m-PCR2 sử dụng DNA ly trích trực tiếp từ dung dịch tăng sinh, kết quả phát hiện gen từ 106 mẫu ở môi trường 1 và 110 mẫu ở môi trường 2 lần lượt là 2 và 2 mẫu dương tính đồng thời hai gen *ctxA* và *rfbO1*, 8 và 11 mẫu dương tính đồng thời hai gen *ctxA* và *rfbO139*, 2 và 4 mẫu chỉ dương tính với *rfbO1*, 2 và 4 mẫu chỉ dương tính với *rfbO139*, 13 và 18 mẫu chỉ dương tính với *ctxA*. Ngoài ra, môi trường tăng sinh 2 còn giúp phát hiện được hai mẫu dương tính đồng thời cả 3 gen *ctxA*, *rfbO1* và *rfbO139*.

Sử dụng DNA của từng gốc đã định danh, kết quả m-PCR2 phát hiện serogroup từ 99 mẫu ở môi trường 1 và 24 mẫu ở môi trường 2 lần lượt là 5 và 3 mẫu dương tính với *V. cholerae* O139 sinh độc tố CT, 11 và 5 mẫu dương tính với *V. cholerae* O1/O139 không sinh độc tố CT, 5 và 2 mẫu dương tính với *V. cholerae* non – O1/O139 sinh độc tố CT.

Kết quả phản ứng m-PCR3 cho thấy chỉ 3 trong 6 mẫu phát hiện được gen *tcpA* đặc trưng cho *V. cholerae* O1 biotype El Tor.

Một số gốc *V. cholerae* phân lập được đều nhạy cảm doxycycline và norfloxacin và đề kháng hoàn toàn với colistine, đề kháng cao với oxacillin.

Từ khóa: *Vibrio cholerae*, Động vật thủy hải sản, Tỷ lệ nhiễm, Serogroup, Biotype, Kỹ thuật m-PCR

**Prevalence of *Vibrio cholerae* in seafood animals and their
serogroups (O1 and O139) and biotypes by m-PCR**

Nguyễn Thị Xuân Trang and Nguyễn Ngọc Tuấn
Summary

A total of 240 samples of marketed shrimp and shellfish were collected from Dong Nai province and Ho Chi Minh City. Two enrichment media were used: ASPW (alkaline salt peptone water) and ASPW supplemented with polymycin B 50 UI and 3 % NaCl. DNA extracted from enriched samples was examined by three m-PCR reactions to identify (i) the species of *V. cholerae* (m-PCR1); (ii) the O1 and O139 serogroups (m-PCR2); and the biotypes (m-PCR3). Besides, isolates from enriched media were examined using conventional methods (biochemical tests) and m-PCRs.

By m-PCR1, *V. cholerae* was detected from 44.2 % of the enriched samples in ASPW medium and 45.8 % of the enriched samples in supplemented ASPW medium,

while the bacteria were isolated from only 41.3 % and 10.0% of the samples (respectively).

Using m-PCR2, two out of 106 ASPW-enriched samples and two out of 110 enriched samples supplemented with polymyxin B were found positive for *ctxA* and *rfbO1*; 8 and 11 samples were positive for *ctxA* and *rfbO139*; 2 and 4 samples, for *rfbO1*; 2 and 4 samples, for *rfbO139*; and *ctxA* was detected from 13 and 18 samples (respectively). Furthermore, *ctxA*, *rfbO1* and *rfbO139* were simultaneously detected from two samples enriched in supplemented ASPW broth.

Using extracted DNA of detected isolates, the result of m-PCR2 of identification of serogroups from 99 samples in ASPW and 24 samples in supplemented ASPW, 5 and 3 samples were positive for toxigenic *V. cholerae* belonging to serogroup O139, 11 and 5 samples were positive for non-toxigenic *V. cholerae* O1/O139; and 5 and 2 samples were positive for *V. cholerae* non-O1/O139 carried CT (respectively).

The results from m-PCR3 showed that *tcpA* El Tor was only detected from three of six samples.

Antibiotic resistance tests showed that *V. cholerae* isolates were completely resistant to colistine; highly resistant to oxacillin; and were sensitive to doxycycline and norfloxacin.

Key words: *Vibrio cholerae*, Seafood animal, Prevalence, Serogroup, Biotype, m-PCR

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vibrio cholerae là tác nhân quan trọng nhất gây bệnh dịch tả trên người, đặc biệt hai serogroup O1, O139 (Nusrin và cs, 2004), gây chết hàng triệu người mỗi năm trên thế giới (Suzita và cs, 2009). *V. cholerae* tồn tại trong môi trường nước, đặc biệt ở các khu vực gần cửa sông (Vicente và cs, 1997). Vì vậy, loài vi khuẩn này rất dễ nhiễm vào các động vật thủy hải sản (Vezzulli và cs, 2010). Do đó việc ăn những sản phẩm thủy hải sản tươi sống hoặc chưa nấu chín là điều kiện để bệnh phát sinh (Shar và cs, 2010).

Trên thế giới đã có rất nhiều nghiên cứu về *V. cholerae*. Tuy nhiên, ở Việt Nam các nghiên cứu về loài vi khuẩn này tương đối ít, các công trình chỉ dừng lại ở mức độ phát hiện *V. cholerae* trên bệnh nhân tiêu chảy cấp. Trong đó phương pháp nuôi cấy và phân lập được thực hiện phổ biến để định danh loài vi khuẩn này và được xem như tiêu chuẩn vàng; tuy nhiên chi phí cao, tốn nhiều thời gian và nhân công; và không thể phân biệt một cách chính xác giữa *V. cholerae* chủng sinh độc tố và không sinh độc tố (Chomvarin và cs, 2007). Hơn nữa, nước ta chưa có nghiên cứu nào liên quan đến ngộ độc thực phẩm từ thức ăn thủy hải sản. Do đó, vấn đề được đặt ra là thường xuyên tầm soát sự hiện diện của các loài vi khuẩn có khả năng gây ngộ độc thực phẩm cho người tiêu thụ sản phẩm thủy hải sản. Đặc biệt, phát hiện nhanh và chính xác *V. cholerae* là việc làm cần thiết. Cho nên m-PCR được xem là công cụ hữu hiệu để giúp xác định nhanh *Vibrio* gây bệnh, nhất là xác định nhanh các serogroup và biotype của *V. cholerae* (Khuntia và cs, 2008).

Mục tiêu của bài báo là so sánh hai phương pháp phát hiện *V. cholerae*, xác định nhanh serogroup O1, O139 và hai biotype của *V. cholerae* serogroup O1 bằng m-PCR, đồng thời đánh giá tính nhạy cảm của vi khuẩn này với một số kháng sinh thông dụng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Mẫu tôm, mẫu nhuyễn thể (khối lượng từ 100-200 g/mẫu) được đựng trong các túi nylon vô trùng và bảo quản trong thùng đá, chuyển nhanh về phòng thí nghiệm. Đối

với mẫu tôm, mẫu được cho vào cốc mở quạ vô trùng, cắt nhuyễn (lấy nguyên thân, đầu). Đối với mẫu nhuyễn thể hai mảnh, sau khi rửa sạch chất bẩn bên ngoài, dùng kẹp vô trùng tách hai vỏ, lấy phần thịt và dịch bên trong cho vào cốc mở quạ vô trùng, cắt nhuyễn. Phần mẫu cắt nhuyễn được tăng sinh trong hai môi trường: (1) môi trường nước pepton muối kiềm (ASPW) và (2) môi trường nước pepton muối kiềm (ASPW) bổ sung 3% NaCl và polymycin B 50UI. Cứ mỗi 10 gam mẫu được cho vào 90ml môi trường tăng sinh, ủ 41,5°C trong 8-12 giờ. Dung dịch tăng sinh được sử dụng để ly trích DNA, đồng thời cũng được dùng để phân lập và định danh *V. cholerae* bằng phản ứng sinh hóa.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Xác định *V. cholerae* bằng các phản ứng sinh hóa

Dung dịch tăng sinh được cấy chuyển lên thạch TCBS (thiosulfate citrate bile saccharose), ủ ở 37°C và kiểm tra sau 18 - 24 giờ. Trên môi trường TCBS, chọn 5 khuẩn lạc màu vàng điển hình cho *V. cholerae* (khuẩn lạc màu vàng, tâm đục, rìa tròn, nhẵn, đường kính từ 2- 3 mm). Mỗi khuẩn lạc được cấy lên từng ống thạch nghiêng TSI, ủ 37°C trong 24 giờ. Các ống thạch TSI đỏ/vàng và không sinh H₂S được chọn để khẳng định bằng các thử nghiệm sinh hóa gồm sucrose dương tính (+), lactose và L-arabinose âm tính (-), D-manitol (+), arginine dihydrolase (-), lysine decarboxylase (+), ornithine decarboxylase (+), urease (-), oxidase (+), citrate và indol (+), o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) (+), mọc được trên môi trường dưới 3% NaCl. Các gốc vi khuẩn cho kết quả sinh hóa phù hợp với *V. cholerae* được cấy lại trên thạch TCBS để nhân thuần và chuyển vào canh BHI, ủ 37°C trong 18 - 24 giờ để giữ gốc. Các gốc được giữ trong canh BHI bổ sung 20% glycerol và bảo quản ở - 20°C.

2.2.2 Ly trích DNA

Đối với dung dịch tăng sinh, lấy 1ml, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 2 phút, phần cặn được hòa tan trong 100 μ l TE 0,5X để ly trích DNA. Đối với các gốc đã kiểm tra sinh hóa, sau khi rửa đông, gốc vi khuẩn được tăng sinh trong BHI (chuyển 100 μ l mẫu đã giữ gốc vào ống eppendorf chứa 1ml BHI), ủ 37°C/ 18-24 giờ, ly tâm như trên, lấy phần cặn hòa tan trong 100 μ l TE 0,5X để ly trích DNA.

Quy trình ly trích DNA được thực hiện theo bộ kit ly trích của Công ty Cổ phần Công nghệ Việt Á, TP HCM.

2.2.3 Xác định tần số xuất hiện *V. cholerae* trên mẫu tôm và nhuyễn thể bằng kỹ thuật multiplex PCR

Kỹ thuật m-PCR được thực hiện với DNA từ hai nguồn gốc khác nhau gồm DNA ly trích trực tiếp từ dung dịch tăng sinh của mẫu khảo sát và DNA ly trích từ dung dịch BHI của từng gốc vi khuẩn *V. cholerae* sau khi đã định danh bằng thử nghiệm sinh hóa. Quy trình được thực hiện với 3 phản ứng m-PCR.

Phản ứng m-PCR1 được sử dụng để xác định sự hiện diện của *V. cholerae* trong mẫu khảo sát bằng cách sử dụng hai cặp mồi (Tarr và cs, 2007). Các mẫu dương tính với *V. cholerae* được ghi nhận và tiếp tục thực hiện phản ứng m-PCR2.

Phản ứng m-PCR2 sử dụng 3 cặp mồi, cặp mồi thứ nhất được thiết kế dựa vào gen *ctxA* đặc trưng cho *V. cholerae*, cặp mồi thứ 2 và thứ 3 được thiết kế để phân biệt hai serogroup O1 và O139 dựa vào trình tự của gen *rfb* (Alam và cs, 2006) để xác định serogroup O1 và O139 của *V. cholerae*. Sau đó, các mẫu dương tính đồng thời ít nhất 2 gen *ctxA* và *rfbO1* được ghi nhận để tiếp tục thực hiện phản ứng m-PCR3 nhằm xác định biotype El Tor hoặc cổ điển của *V. cholerae* O1.

Phản ứng m-PCR3 được thực hiện để phân biệt biotype El Tor và cổ điển của *V. cholerae* O1. Các đoạn mồi được thiết kế phân biệt hai biotype dựa vào gen *tcpA*

(Rivera và cs, 2001). Trình tự của các đoạn mồi và kích cỡ sản phẩm PCR được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự nucleotid của các đoạn mồi trong các phản ứng m-PCR

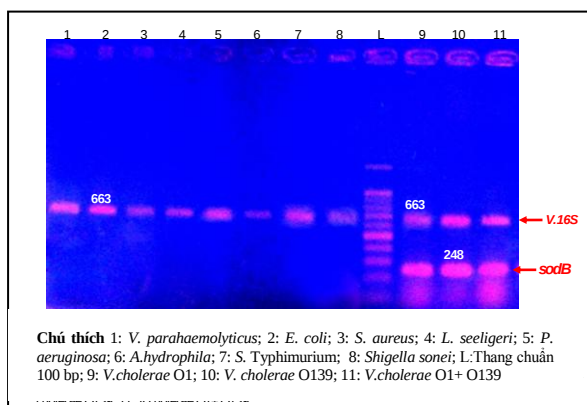
Xác định	Mồi	Trình tự 5' – 3'	Kích cỡ (bp)	Phản ứng	Nguồn
<i>V. cholerae</i>	Vc.sodB-F Vc.sodB-R	AAG ACC TCA ACT GGC GGT A GAA GTG TTA GTG ATC GCC AGA GT	248	m-PCR1	Tarr và cs, 2007
<i>All vibrio spp.</i>	V.16S- 700F V.16S-1325R	CGG TGA AAT GCG TAG AGA T TTA CTA GCG ATT CCG AGT TC	663		
<i>V. cholerae</i>	ctxA-F ctxA-R	CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG TCT ATC TCT GTA GCC CCT ATT ACG	302	m-PCR2	Alam và cs, 2006
<i>V. cholerae</i> O1	O1rfb-F O1 rfb-R	GTT TCA CTG AAC AGA TGG G GGT CAT CTG TAA GTA CAA C	192		
<i>V. cholerae</i> O139	O139rfb-F O139rfb-R	AGC CTC TTT ATT ACG GGT GG GTC AAA CCC GAT CGT AAA GG	449		
<i>V. cholerae</i> O1 El Tor <i>V. cholerae</i> O1 Classical	tcpA-72-F tcp-477-R tcp-647-R	CAC GAT AAG AAA ACC GGT CAA GAG CGA AAG CAC CTT CTT TCA CGT TG TTA CCA AAT GCA ACG CCG AAT G	451 620	m-PCR3	Rivera và cs, 2001

2.2.4 Thành phần phản ứng và quy trình nhiệt của các phản ứng m-PCR

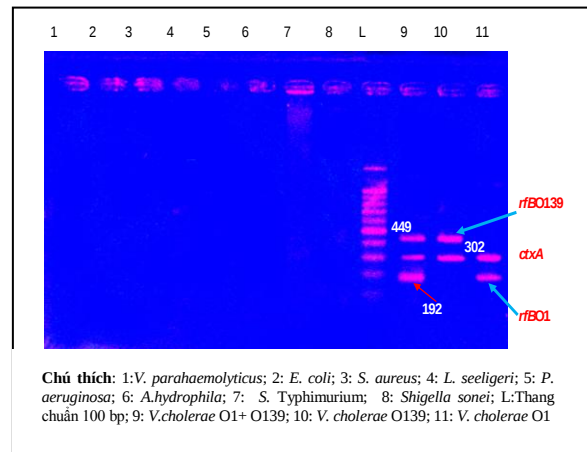
Các phản ứng m-PCR được thực hiện với cùng nồng độ hóa chất và quy trình nhiệt. Thành phần phản ứng m-PCR gồm 13,5 µl hỗn hợp master mix (2 UI AmpliTaq gold; 0,2 mM dNTP; buffer 10X; 1,5 mM MgCl₂); 0,5 µl mỗi đoạn mồi (nồng độ 0,625 µM); 5 µl DNA khuôn mẫu và nước cất khử ion hai lần vừa đủ 25 µl. Quy trình nhiệt của các phản ứng m-PCR: 95°C/5 phút (1 chu kỳ); 95 °C/30 giây, 50 °C/30 giây, 72°C/1 phút (40 chu kỳ); 72 °C/6 phút (1 chu kỳ).

2.3.5 Điện di và đọc kết quả

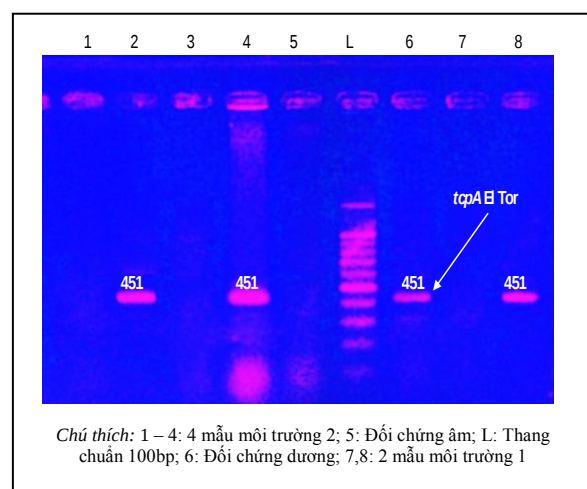
Quá trình điện di được thực hiện với dung dịch TAE 1X trên gel agarose 1,5%, thời gian điện di là 50V/5 phút; 75V/45 phút. Sau khi điện di, băng gel agarose được nhuộm bằng dung dịch ethium bromide 1/10.000 và nhận diện nhờ máy chiếu tia UV (Hình 1, Hình 2 và Hình 3).



Hình 1. Sản phẩm m-PCR1



Hình 2. Sản phẩm m-PCR2



Hình 3. Sản phẩm m-PCR3

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 So sánh kết quả định danh *V. cholerae* bằng phương pháp sinh hóa và m-PCR

Với 240 mẫu thu thập ở hai địa bàn khảo sát gồm hai loại mẫu (tôm và nhuyễn thể), mẫu được tăng sinh trên hai môi trường khác nhau, sau đó tiến hành định danh *V. cholerae* bằng hai phương pháp sinh hóa và m-PCR. Kết quả ở bảng 2 cho thấy *V. cholerae* định danh được bằng phương pháp m-PCR cao hơn phương pháp sinh hóa ở cả hai môi trường tăng sinh (44,2% so với 41,3% ở môi trường 1 và 45,8% so với 10,0% ở môi trường 2).

Đối với phương pháp sinh hóa, môi trường 1 cho tỷ lệ định danh *V. cholerae* cao hơn nhiều so với môi trường 2 (41,3 % so với 10,0 %). Ngược lại, đối với phương pháp m-PCR phát hiện loài *V. cholerae* thì môi trường 2 giúp tỷ lệ phát hiện cao hơn môi trường 1 (45,8 % so với 44,2%).

3.2 Tần số xuất hiện *V. cholerae* O1 và O139 trên mẫu tôm và nhuyễn thể cho kết quả dương tính với *V. cholerae* ở m-PCR 1

Phản ứng m-PCR2 được thực hiện với DNA ly trích từ hai nguồn gốc khác nhau: 216 mẫu DNA (106 mẫu ở môi trường 1 và 110 mẫu ở môi trường 2) được ly trích từ dung dịch tăng sinh của các mẫu dương tính với *V. cholerae* ở m-PCR1 để xác định sự hiện diện của gen độc lực *ctxA*, gen *rfbO1* và *rfbO139* và 375 mẫu DNA được ly trích từ 375 gốc *V. cholerae* đã được định danh bằng thử nghiệm sinh hóa và khẳng định lại bằng m-PCR1 để xác định sự hiện diện của serogroup O1 và O139 trong các gốc định danh được (phân lập từ môi trường TCBS và thử sinh hóa).

Bảng 2. So sánh tỷ lệ phát hiện *V. cholerae* giữa phương pháp sinh hóa và m-PCR DNA ly trích từ dung dịch tăng sinh

Dung dịch pepton muối kiềm (Môi trường 1)												
Địa điểm Phương pháp Loại mẫu	Đồng Nai (n = 127)				Tp. Hồ Chí Minh (n = 113)				Tổng cộng (N = 240)			
	Sinh hóa		m-PCR1		Sinh hóa		m-PCR1		Sinh hóa		m-PCR1	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Tôm	13	34,2	13	34,2	14	42,4	14	42,4	27	38,0	27	38,0
Nhuuyễn thể	34	38,2	40	44,9	38	47,5	39	48,7	72	42,6	79	46,7
Chung	47	37,0	53	41,7	52	46,0	53	46,9	99	41,3	106	44,2
Dung dịch nước pepton muối kiềm bổ sung polymycin B 50UI và 3% NaCl (Môi trường 2)												
Địa điểm Phương pháp Loại mẫu	Đồng Nai (n = 127)				Tp. Hồ Chí Minh (n = 113)				Tổng cộng (N = 240)			
	Sinh hóa		m-PCR1		Sinh hóa		m-PCR1		Sinh hóa		m-PCR1	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Tôm	0	0,00	4	10,5	5	15,2	12	36,4	6	8,4	17	23,9
Nhuuyễn thể	8	8,9	50	56,2	12	15,0	43	53,7	18	10,7	93	55,0
Chung	8	6,3	54	42,5	17	15,0	55	48,7	24	10,0	110	45,8

Ghi chú: Tôm: n = 71 (Đồng Nai: 38 mẫu; TP. Hồ Chí Minh: 33 mẫu)

Nhuuyễn thể: n = 169 (Đồng Nai: 89 mẫu; TP. Hồ Chí Minh: 80 mẫu)

Bảng 3. Kết quả số mẫu dương tính với các gen trong phản ứng m-PCR2 sử dụng

Các gen đích	Môi trường 1 (n = 106)		Môi trường 2 (n = 110)	
	n	%	n	%
<i>ctxA</i> + <i>rfbO1</i> + <i>rfbO139</i>	0	0,0	2	1,8
<i>ctxA</i> + <i>rfbO1</i>	2	1,9	2	1,8
<i>ctxA</i> + <i>rfbO139</i>	8	7,5	11	10,0
<i>rfbO1</i>	2	1,9	4	3,6
<i>rfbO139</i>	2	1,9	4	3,6
<i>ctxA</i>	13	12,3	18	16,4
Tổng số mẫu dương tính	27 ^a	26,4	41 ^b	37,3

Ghi chú: a, b: khác biệt có ý nghĩa thống kê

Kết quả Bảng 3 cho thấy phương pháp tăng sinh bằng môi trường 2 giúp m-PCR2 phát hiện các gen mục tiêu cao hơn môi trường 1 (41 mẫu so với 27 mẫu) và khả năng phát hiện đồng thời 2-3 gen cũng cao hơn môi trường 1 (15 mẫu so với 10 mẫu). Ngoài ra, khi dùng môi trường 2 tăng sinh còn giúp m-PCR2 phát hiện 2 mẫu dương tính đồng

thời gen *ctxA* cùng với *rfbO1* và *rfbO139* mà ở môi trường 1 không giúp phát hiện được; hoặc 2 mẫu ở môi trường 1 so với 4 mẫu ở môi trường 2 đối với gen *rfbO1*; hoặc 2 mẫu ở môi trường 1 so với 4 mẫu ở môi trường 2 đối với gen *rfbO139*, hoặc 13 mẫu ở môi trường 1 so với 18 mẫu ở môi trường 2 đối với gen *ctxA*.

Kết quả dương tính đồng thời của gen *ctxA* và gen *rfbO1* hoặc/ và *rfbO139* cho thấy khả năng hiện diện các *V. cholerae* mang gen độc lực trong mẫu khảo sát. Nhằm xác định sự hiện diện của các serogroup này trong mẫu khảo sát, m-PCR2 được tiến hành với DNA của 375 gốc (tương ứng 123 mẫu thực địa) *V. cholerae* đã được định danh (Bảng 4).

Bảng 4. Tần số xuất hiện *V. cholerae* O1 và O139 trên mẫu khảo sát (DNA của từng gốc định danh bằng sinh hóa)

Serogroup của <i>V. cholerae</i>	Môi trường 1 (n = 99)		Môi trường 2 (n = 24)	
	n	%	n	%
<i>V. cholerae</i> O1 có độc tố CT (<i>ctxA</i> + <i>rfbO1</i>)	0	0,0	0	0,0
<i>V. cholerae</i> O139 có độc tố CT (<i>ctxA</i> + <i>rfbO139</i>)	5	5,0	3	9,4
<i>V. cholerae</i> O1 không có độc tố CT (<i>rfbO1</i>)	3	3,0	2	8,3
<i>V. cholerae</i> O139 không có độc tố CT (<i>rfbO139</i>)	8	8,1	3	12,5
<i>V. cholerae</i> non – O1/139 có độc tố (<i>ctxA</i>)	5	5,0	2	8,3

Kết quả Bảng 4 cho thấy 5 mẫu ở môi trường 1 và 3 mẫu ở môi trường 2 được xác định sự hiện diện của *V. cholerae* serogroup O139 có độc tố CT, không có mẫu nào phát hiện được *V. cholerae* serogroup O1 sinh độc tố CT. Ngoài ra, có 3 mẫu ở môi trường 1 và 2 mẫu môi trường 2 hiện diện *V. cholerae* serogroup O1 không sinh độc tố CT; 8 mẫu ở môi trường 1 và 3 mẫu môi trường 2 hiện diện *V. cholerae* serogroup O139 không sinh độc tố CT; 5 mẫu ở môi trường 1 và 2 mẫu môi trường 2 hiện diện *V. cholerae* thuộc các serogroup non – O1/ non – O139 sinh độc tố CT.

3.3 Xác định biotype của *V. cholerae* O1 trên mẫu tôm và nhuyễn thể cho kết quả dương tính với *V. cholerae* O1 ở m-PCR 2

DNA của các mẫu dương tính đồng thời ít nhất hai gen *ctxA* và *rfbO1* ở phản ứng m-PCR2 (2 mẫu ở môi trường 1 và 4 mẫu ở môi trường 2, xem Bảng 3) được sử dụng để xác định biotype của *V. cholerae* O1. Kết quả cho thấy 1 mẫu ở môi trường 1 và 2 mẫu ở môi trường 2 cho kết quả dương tính với gen *tcpA* đặc trưng cho *V. cholerae* O1 biotype El Tor, không mẫu nào cho kết quả với *tcpA* đặc trưng cho *V. cholerae* O1 biotype cổ điển (Hình 3).

Thảo luận

Phương pháp PCR cho kết quả phát hiện *V. cholerae* chính xác và nhạy hơn nhiều so với phương pháp sinh hóa. Lý do là phương pháp PCR có thể phát hiện được các dòng *V. cholerae* tồn tại hoặc không tồn tại trên môi trường phân lập (Lipp và cs, 2003). Bên cạnh đó, phương pháp PCR sử dụng DNA tách chiết từ dung dịch tăng sinh sẽ cho kết quả phát hiện *V. cholerae* nhanh hơn, chính xác và độ nhạy cao hơn so với phương pháp nuôi cấy truyền thống (Lipp và cs, 2003). Tuy vậy, khi sử dụng DNA tách chiết từ dung dịch tăng sinh để thực hiện phản ứng m-PCR thì không thể khẳng định sự tồn tại của các serogroup của *V. cholerae* mang gen độc lực mà chỉ cho thấy nguy cơ hiện diện của các dòng vi khuẩn này trong mẫu khảo sát.

Tần số xuất hiện của *V. cholerae* trong mẫu tôm và nhuyễn thể ở hai địa bàn khảo sát khá cao (Bảng 2). Tuy nhiên, khả năng xuất hiện của các serogroup mang gen độc lực của *V. cholerae* trong mẫu khảo sát rất thấp (Bảng 3 và Bảng 4). Điều đó cho thấy các serogroup của *V. cholerae* tồn tại trong mẫu khảo sát cũng như trong môi

trường chủ yếu là non-O1, O139 (Goel và cs, 2010) hoặc những dòng *V. cholerae* O1 và O139 không sinh độc tố CT (Kaper và cs, 1995). Tỷ lệ phát hiện gen *sodB* của *V. cholerae* trong phân vật nuôi là 32% (74/230 mẫu), trong số này, chỉ phát hiện 20/74 mẫu có mang gen *rfb* của *V. cholerae* O1 và không có mẫu nào dương tính với *V. cholerae* O139 (Keshav và cs, 2010).

Chúng tôi tiến hành định biotype của 6 mẫu cho kết quả dương tính đồng thời với ít nhất 2 gen của *V. cholerae* O1, nhưng chỉ có 3 mẫu cho kết quả dương tính với gen *tcpA* (Hình 3). Thật vậy, trái với nghiên cứu trước đây cho rằng hầu hết các dòng *V. cholerae* O1 đều cho kết quả dương tính với *ctxA* và *tcpA* (Faruque và cs, 1998), 37% số mẫu được xác định là *V. cholerae* O1 đã không hiện diện gen *ctxA* và *tcpA* (Aulet và cs, 2007). Ngoài ra, một số nghiên cứu đã chứng minh một số dòng *Vibrio cholerae* non-O1/ non-O139 cũng có khả năng mang đồng thời hai gen độc lực *ctxA* và *tcpA* (Singh và cs, 2001).

Kết quả nghiên cứu cho thấy không có mẫu nào (dung dịch tăng sinh hoặc gốc phân lập được) cho kết quả dương tính với *V. cholerae* O1 biotype cổ điển. Từ năm 1961, *V. cholerae* O1 biotype El Tor đã thay thế *V. cholerae* O1 biotype cổ điển trong các ổ dịch tả (Alm và Manning, 1990). Hầu hết các gốc phân lập từ Việt Nam và Bangladesh đều là El Tor (Minh và cs, 2009). Tuy nhiên, không phải tất cả các nghiên cứu đều cho thấy *V. cholerae* O1 biotype cổ điển đã biến mất mà chúng vẫn đang tồn tại. Nghiên cứu của Safa và cs (2008) khảo sát 41 dòng *V. cholerae* O1 phân lập ở châu Á và châu Phi từ năm 1991 đến năm 2004 cho thấy tất cả các dòng đều cho kết quả dương tính với gen *rfb* O1, hầu hết mang gen *tcpA* đặc hiệu cho biotype cổ điển (451bp) ngoại trừ 5 dòng ở Việt Nam đều mang *tcpA* El Tor.

3.3 Kết quả kháng sinh đồ của *V. cholerae* định danh được

Nghiên cứu đã tiến hành thử kháng sinh đồ để đánh giá tính nhạy cảm của 9 gốc *V. cholerae* định danh được đối với các loại kháng sinh thường sử dụng để điều trị bệnh tả. Kết quả kháng sinh đồ của các gốc *V. cholerae* định danh được thể hiện qua Bảng 5.

Bảng 5. Tính nhạy cảm của *V. cholerae* với một số loại kháng sinh (n = 9)

Kháng sinh	Nhạy		Trung gian		Kháng	
	n	%	n	%	n	%
Amoxicillin	3	33,3	2	22,2	4	44,4
Cloramphenicol	7	77,8	1	11,1	1	11,1
Colistine	0	0,0	0	0,0	9	100,0
Doxycycline	9	100,0	0	0,0	0	0,0
Gentamicin	8	88,9	0	0,0	1	11,1
Norfloxacin	9	100,0	0	0,0	0	0,0
Oxacillin	1	11,1	0	0,0	8	88,9
Polymycin B	3	33,3	0	0,0	6	66,7
Trimethoprim/sulfamethoxazol	4	44,4	0	0,0	5	55,6
Vancomycin	2	22,2	3	33,3	4	44,4

Kết quả cho thấy *V. cholerae* nhạy cảm hoàn toàn với doxycycline và norfloxacin (100%); khá nhạy cảm với gentamicin (88,9%) và cloramphenicol (77,8%); đề kháng hoàn toàn với colistine (100%) và đề kháng cao với oxacillin (88,9%) và tương đối kháng polymycin B (66,7%), vancomycin (44,4%) và trimethoprim/sulfamethoxazole (55,6%).

Vấn đề đề kháng kháng sinh của *V. cholerae* đã được rất nhiều tác giả nghiên cứu trước đây, kết quả cho thấy khả năng đề kháng của vi khuẩn này rất đa dạng, tùy thuộc vào thời gian và địa điểm nghiên cứu. Ở nước ta, các dòng *V. cholerae* O1/non-O1 từ năm 1995- 2002 đề kháng với streptomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim

(Ehara và cs, 2004), các dòng phân lập năm 2003 thì đề kháng với amoxicillin và erythromycin (Bani và cs, 2007).

V. cholerae phân lập ở Bangladesh 2002-2008 đề kháng với tetracycline, ciprofloxacin, sulfamethoxazole/trimethoprim, erythromycin và furazolidone (Kim và cs, 2010). Theo Ang và cs (2010) các dòng *V. cholerae* O1 El Tor phân lập được ở Malaysia năm 2009 có khả năng đề kháng với nhiều loại kháng sinh bao gồm tetracycline, erythromycin, streptomycin, penicillin G, sulfamethoxazole/trimethoprim và polymyxin B. Gần đây nhất, *V. cholerae* O1 ở Indonesia đề kháng với erythromycin nhưng nhạy cảm với nhiều loại kháng sinh ampicillin, ciprofloxacin, cloramphenicol, tetracycline, gentamicin, kanamycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, norfloxacin, streptomycin và axit nalidixic (Nishibori và cs, 2011).

IV KẾT LUẬN

Môi trường nước muối pepton kiềm là môi trường tăng sinh hiệu quả để định danh *V. cholerae* bằng phương pháp sinh hóa, bổ sung polymyxin B và 3% NaCl vào môi trường này rất có ích cho việc phát hiện các gen độc lực của loài vi khuẩn này bằng phương pháp m-PCR.

Tần số xuất hiện của *V. cholerae* trong mẫu tôm và nhuyễn thể khá cao (hơn 40%) nhưng sự hiện diện của các serogroup O1, O139 sản sinh độc tố CT trong mẫu khảo sát rất thấp (5 mẫu ở môi trường 1 và 3 mẫu ở môi trường 2).

Chỉ phát hiện được gen *tcpA* đặc trưng cho *V. cholerae* O1 biotype El Tor ở 3/6 mẫu khảo sát, không mẫu nào cho kết quả dương tính với *tcpA* đặc trưng cho *V. cholerae* O1 biotype cổ điển.

Một số gốc *V. cholerae* phân lập được đều nhạy cảm doxycycline và norfloxacin và đề kháng hoàn toàn với colistine, đề kháng cao với oxacillin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alam M., Sultana M., Nair G. B., Sack R. B., Sack D. A., Siddique A. K., Ali A., Huq A. and Colwell R. R., 2006. Toxigenic *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (4): 2849-2855.
2. Ang G. Y., Yu C. Y., Balqis K., Elina H. T., Azura H., Hani M. H. and Yean C. Y., 2010. Molecular evidence of cholera outbreak caused by a toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant strain in Kelantan, Malaysia. *Journal of Clinical Microbiology* 48 (11): 3963-3969.
3. Bani S., Mastromarino P. N., Ceccarelli D., An L. V., Salvia A. M., Tram N. V. Q., Hai D. H., Bacciu D., Cappuccinelli P. and Colombo M. M., 2007. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* and its disappearance in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in 2003 in Vietnam. *FEMS Microbiology Letters* 266: 42-48.
4. Ehara M., Nguyen B. M., Nguyen D. T., Toma C., Higa N. And Iwanaga M., 2004. Drug susceptibility and its genetic basis in epidemic *Vibrio cholerae* O1 in Vietnam. *Epidemiology and Infection* 132: 595-600.
5. Faruque S. M., Albert M. J. and Mekalanos J. J., 1998. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(4): 1301-1314.
6. Kim H. B., Wang M., Ahmed S., Park C. H., LaRocque R. C., Faruque A. S., Salam M. A., Khan W. A., Qadri F., Calderwood S. B., Jacoby G. A. and Hooper D. C., 2010. Transferable quinolone resistance in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (2): 799-803.

- 7.Minh N. B., Lee H. J., Cuong N. T., Choi Y. S., Hien N. T., Anh D. D., Lee R. H., Ansaruzzaman M., Endtz P. H., Chun J., Lopez L. A., Czerkinsky C., Clemens D. J. and Kim W. D., 2009. Cholera outbreaks caused by an altered *Vibrio cholerae* O1 EI Tor biotype strain producing classical cholera toxin B in Vietnam in 2007 to 2008. *Journal of Clinical Microbiology* 47(5): 1568-1571.
- 8.Nishibori T.,Cores de Vries G., Rahardjo D., Wasito E. B., De I., Kinoshita S., Hayashi Y., Hotta H., Kawabata M., Shirakawa T., Iijima Y. and Osawa R., 2011. Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio cholerae* clinically isolated in Surabaya, Indonesia. *Indonesia – Japan journal infectious diseases* 64: 7-12.
- 9.Singh D. V., Matte M., Matte g. R., Jiang S., Sabeena F., Shukla B. N., Sanyal S. C., Huq A. and Colwell R. R., 2001. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non – O1, and non – O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2): 910-921
- 10.Tarr C. L., Patel S. J., Puhf N. D., Sowers E. G., Bopp C. A. and Strockbine N. A., 2007. Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *Journal of Clinical Microbiology* 45 (1): 134-140.