

**ỨNG DỤNG KỸ THUẬT MULTIPLEX-PCR PHÁT HIỆN VIBRIO CHOLERAЕ,
VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS VÀ CÁC GEN ĐỘC LỰC
CỦA CHÚNG TỪ SẢN PHẨM THỦY HẢI SẢN**

Đến toà soạn 10 - 5 - 2015

Trương Huỳnh Anh Vũ

Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm thành phố Hồ Chí Minh (CASE)

Nguyễn Ngọc Tuấn

Trường Đại học Nông lâm TP. Hồ Chí Minh

SUMMARY

**APPLICATION OF MULTIPLEX-PCR TECHNIQUE FOR DETECTION OF
VIBRIO CHOLERAЕ, VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS AND THEIR VIRULENCE
GENES FROM SEAFOOD**

*The objective of this study were to compare the ability to detect *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* by conventional methods using TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose), CAV (CHROMagar™ *Vibrio*) medium and PCR method; and also to identify the presence of virulence genes of *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* from fresh seafood by using *m*-PCR technique. A total of 313 samples (126 from fillet fish, 52 from shrimp and 135 from clam) were collected at Center of analytical services and experimentation in HCMC.*

Keywords: *Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, virulence gene; fresh shrimp, fish fillet and clam product.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

An toàn vệ sinh thực phẩm nói chung và an toàn sản phẩm nuôi trồng thủy sản nói riêng là vấn đề quan tâm hàng đầu của nhiều quốc gia cũng như các thị trường thực phẩm trên thế giới trong đó có Việt Nam. Việc sử dụng cũng như tiêu thụ sản phẩm thủy hải sản không an toàn thường gây ra các trường hợp ngộ độc nghiêm trọng.

Nhóm *Vibrio* được biết như là tác nhân chính gây ngộ độc thực phẩm trong các sản phẩm thủy hải sản tươi sống. Trong những loài *Vibrio* gây bệnh, người ta thường quan tâm đến *V. cholerae* và *V. parahaemolyticus*. Do đó, 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 tươi là vấn đề cần đặt ra thường xuyên

nhằm góp phần vào việc bảo vệ sức khỏe cộng đồng. Trong chương trình tầm soát đó, việc phát hiện nhanh và chính xác *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* là một yêu cầu rất cần thiết. Mục tiêu nghiên cứu của chúng tôi là so sánh khả năng phát hiện *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* bằng phương pháp truyền thống sử dụng môi trường phân lập TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose), CAV (CHROMagar™ *Vibrio*) và phương pháp PCR. Ngoài ra trong các nghiên cứu này chúng tôi có kiểm tra khả năng sử dụng kỹ thuật m-PCR để phát hiện các gen độc lực của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và *V. cholerae* trong sản phẩm thủy hải sản.

2. PHƯƠNG PHÁP – THỰC NGHIỆM

2.1. Chuẩn bị mẫu

Có 313 mẫu (fillet cá:126; Tôm:52; Nghêu:135) thành phẩm thủy hải sản tươi hoặc đông lạnh được thu thập từ dịch vụ phân tích tại Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm TP. Hồ Chí Minh.

2.2. Phân lập *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*
V. cholerae, *V. parahaemolyticus* được phân lập từ các mẫu khảo sát theo ISO/TS 21872-1:2007 [4]

2.3. Ly trích DNA

Đối với dịch tăng sinh, lấy 1 ml cho vào eppendorf. Đối với các chủng đã kiểm tra sinh hóa, dùng que cấy tròn lấy một vòng khuẩn lạc trên thạch NA cho vào Eppendorf chứa sẵn 1 ml nước cất vô trùng. Quy trình ly trích DNA được thực hiện theo bộ kit

của Công ty TNHH Công nghệ Sinh học Khoa Thương.

2.4. Phát hiện *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, gen *ctxA*, *rfb* của *V. cholerae* và gen *tlh*, *tdh* của *V. parahaemolyticus*

- Kỹ thuật m-PCR được thực hiện với DNA từ hai nguồn gốc: DNA ly trích trực tiếp từ dung dịch tăng sinh của mẫu khảo sát và DNA ly trích từ các chủng *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* 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*, *V. parahaemolyticus* trong mẫu khảo sát bằng cách sử dụng hai cặp mồi [3]. Các mẫu dương tính với *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* được ghi nhận và tiếp tục thực hiện phản ứng m-PCR2 và m-PCR3.

- 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* [1] để xác định serogroup O1 và O139 của *V. cholerae*.

- Phản ứng m-PCR3 được thực hiện để phát hiện gen *tlh*, *tdh* của *V. parahaemolyticus* bằng cách sử dụng hai cặp mồi [2]. 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	Primer	Trình tự 5' – 3'	Kích cỡ (bp)	Phản ứng	Nguồn
<i>V. cholerae</i>	<i>Vc.sodB</i> -F	AAG ACC TCA ACT GGC GGT A	248	m-PCR1	Tarr và cs, 2007
	<i>Vc.sodB</i> -R	GAA GTG TTA GTG ATC GCC AGA GT			
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Vp flaE</i> -79F	GCA GCT GAT CAA AAC GTT GAG T	897	m-PCR2	Alam và cs, 2006
	<i>Vp flaE</i> -934R	ATT ATC GAT CGT GCC ACT CAC			
<i>ctx A</i>	<i>ctxA</i> -F	CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG	302	m-PCR3	Bej và cs, 1999
	<i>ctxA</i> -R	TCT ATC TCT GTA GCC CCT ATT ACG			
O1 <i>rfb</i>	O1 <i>rfb</i> -F	GTT TCA CTG AAC AGA TGG G	192	m-PCR2	Bej và cs, 1999
	O1 <i>rfb</i> -R	GGT CAT CTG TAA GTA CAA C			
O139 <i>rfb</i>	O139 <i>rfb</i> -F	AGC CTC TTT ATT ACG GGT GG	449	m-PCR3	Bej và cs, 1999
	O139 <i>rfb</i> -R	GTC AAA CCC GAT CGT AAA GG			
<i>tlh</i>	<i>tlh</i> -F	AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG	450	m-PCR3	Bej và cs, 1999
	<i>tlh</i> -R	GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC			
<i>tdh</i>	<i>tdh</i> -F	GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC	270	m-PCR3	Bej và cs, 1999
	<i>tdh</i> -R	TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC			

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

Thành phần phản ứng m-PCR gồm 2 UI AmpliTaq Gold; 0,2 mM dNTP; 1,5 mM MgCl₂; buffer 1X; 0,5 µl mồi đoạn mồi (nồng độ 0,625 µM); 5 µl DNA khuôn mẫu và nước cất khử ion vừa đủ thể tích 25 µl.

Quy trình nhiệt của phản ứng m-PCR1: 93°C/15 phút (1 chu kỳ); 92°C/40 giây, 57°C/1 phút, 72°C/1,5 phút (35 chu kỳ); 72°C/7 phút (1 chu kỳ).

Quy trình nhiệt của phản ứng m-PCR2: 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).

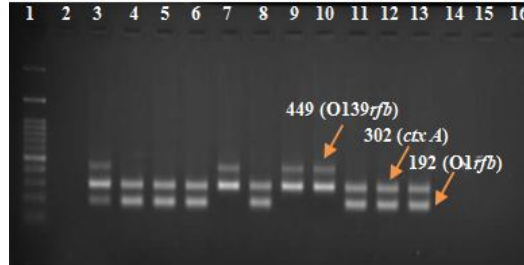
Quy trình nhiệt của phản ứng m-PCR3: 94°C/3 phút (1 chu kỳ); 94°C/1 phút,

58⁰C/1 phút, 72⁰C/1 phút (30 chu kỳ);
72⁰C/5 phút (1 chu kỳ).

2.6. Điện di và đọc kết quả

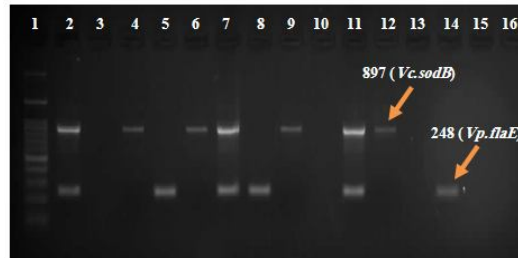
Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% có chứa 1 µg/ml ethidium

bromide trong TBE. Thang ladder cũng được điện di đồng thời. Thời gian điện di là 35 – 40 phút ở 100 V và 100 mA. Sau đó chụp hình gel với tia UV bằng máy chụp gel Ingenius (Hình 1, Hình2 và Hình 3).



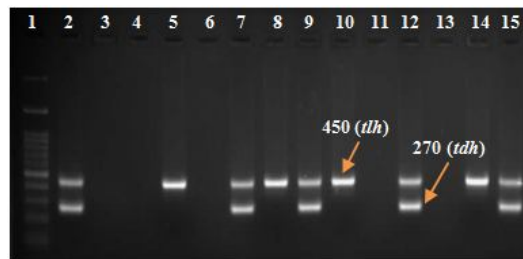
Chú thích: 1: Thang chuẩn 100 bp; 2: Đối chứng dương;
3: Đối chứng âm; 4-16: Mẫu khảo sát

Hình 1. Kết quả phát hiện *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* bằng phản ứng m-PCR1



Chú thích: 1: Thang chuẩn 100 bp; 2: Đối chứng âm;
3: Đối chứng dương; 4-16: Mẫu khảo sát

Hình 2. Kết quả phát hiện các gen độc lực của *V. cholerae* bằng phản ứng m-PCR2



Chú thích: 1: Thang chuẩn 100 bp; 2: Đối chứng dương;
3: Đối chứng âm; 4-15: Mẫu khảo sát

Hình 3. Kết quả phát hiện các gen độc lực của *V. parahaemolyticus* bằng phản ứng m-PCR3

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1. Tỷ lệ phát hiện *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* giữa môi trường TCBS và CAV

Tỷ lệ phát hiện *V. parahaemolyticus* phân lập trên môi trường CAV cao hơn so với

môi trường TCBS (37,7% so với 22,0%). Đối với từng loại mẫu, tỷ lệ phát hiện *V. parahaemolyticus* cũng rất khác nhau. Trong đó tỷ lệ phát hiện *V. parahaemolyticus* ở mẫu ngẫu nhiên cao hơn so với các mẫu khác (TCBS: 31,1%, CAV:

52,6%). Tương tự, trên môi trường CAV tỷ lệ phát hiện *V. cholerae* cao hơn so với môi trường TCBS (24,3%). Mặt khác, đối với từng loại mẫu khảo sát, tỷ lệ nhiễm *V.*

cholerae cũng khác nhau. Đáng quan tâm hơn là mẫu nghêu có mức độ nhiễm *V. cholerae* cao hơn các mẫu còn lại (TCBS: 20,0%, CAV: 36,3%) (Bảng 2).

Bảng 2. So sánh tỷ lệ phát hiện *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* giữa TCBS và CAV

Môi trường	TCBS				CAV			
Chỉ tiêu	<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. cholerae</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. cholerae</i>	
Loại mẫu	n	%	n	%	n	%	n	%
Fillet cá (126)	24	19,0	8	6,3	32	25,4	16	12,7
Tôm (52)	3	5,8	4	7,7	15	28,8	11	21,2
Nghêu (135)	42	31,1	27	20,0	71	52,6	49	36,3
Tổng cộng	69	22,0	39	12,5	118	37,7	76	24,3

Ghi chú: Fillet cá: n = 126 mẫu; Tôm: n = 52; Nghêu: n = 135

3.2. So sánh kết quả phát hiện *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp truyền thống và PCR

Tỷ lệ phát hiện *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp m-PCR1 cao hơn phương pháp truyền thống ở cả hai môi trường phân lập TCBS và CAV (Bảng 3 và 4). Đối với *V. cholerae* tỷ lệ phát hiện của m-PCR1 chênh lệch không

đáng kể so với phương pháp truyền thống sử dụng môi trường CAV (Bảng 3). Tuy nhiên, tỷ lệ phát hiện *V. parahaemolyticus* bằng m-PCR1 lại cao hơn nhiều so với phương pháp truyền thống sử dụng cả hai môi trường TCBS và CAV (Bảng 4). Phương pháp m-PCR1 có tỷ lệ phát hiện loài *V. parahaemolyticus* cao hơn nhiều so với loài *V. cholerae* (43,5% so với 27,5%).

Bảng 3. Tỷ lệ phát hiện *V. cholerae* giữa phương pháp truyền thống và m-PCR

Môi trường	TCBS				CAV			
Phương pháp	m-PCR1		Truyền thống		m-PCR1		Truyền thống	
Loại mẫu	n	%	n	%	n	%	n	%
Fillet cá (126)	20	15,9	8	6,3	20	15,9	16	12,7
Tôm (52)	11	21,2	4	7,7	11	21,2	11	21,2
Nghêu (135)	55	40,7	27	20,0	55	40,7	49	36,3
Tổng cộng	86	27,5	39	12,5	86	27,5	76	24,3

Ghi chú: fillet cá: n = 126 mẫu; Tôm: n = 52; Nghêu: n = 135

Bảng 4. Tỷ lệ phát hiện *V. parahaemolyticus* giữa phương pháp truyền thống và m-PCR

Môi trường	TCBS				CAV			
Phương pháp	m-PCR1		Truyền thống		m-PCR1		Truyền thống	
Loại mẫu	n	%	n	%	n	%	n	%
Fillet cá (126)	43	34,1	24	19,0	43	34,1	32	25,4
Tôm (52)	18	34,6	3	5,8	18	34,6	15	28,8
Nghêu (135)	75	55,6	42	31,1	75	55,6	71	52,6
Tổng cộng	136	43,5	69	22,0	136	43,5	118	37,7

Ghi chú: fillet cá: $n = 126$ mẫu; Tôm: $n = 52$; Nghêu: $n = 135$

3.3. Kết quả phát hiện các gen độc lực của *V. cholerae*

Từ kết quả phân tích ở Bảng 5 nhận thấy tỷ lệ *V. cholerae* O1 và *V. cholerae* O139 sinh độc tố tả (CT) từ DNA của dịch tăng sinh mẫu là 16,28% so với các chủng phân lập là 7,69% và 7,89%; tỷ lệ nhóm *V. cholerae* non-O1 và *V. cholerae* non-O139 sinh độc tố tả (CT) từ DNA của dịch tăng sinh mẫu là 5,81% cao hơn từ chủng phân lập (0 và 2,63%); trái lại *V. cholerae* O1 và *V. cholerae* O139 không sinh độc tố tả từ DNA của dịch tăng sinh là 8,14% tương đương với DNA của chủng phân lập từ TCBS (7,69%) nhưng thấp hơn DNA của chủng phân lập từ CAV (10,53%).

Như vậy DNA tách chiết từ dung dịch tăng sinh mẫu đã sở hữu nhiều gen độc lực với tỷ lệ cao hơn so với DNA của các chủng phân lập. Điều này cho phép ta nhận định rằng mỗi mẫu xét nghiệm đã dương tính với m-PCR1 thì DNA tách chiết trực tiếp từ dung dịch tăng sinh ASPW đã bao hàm khá nhiều số tế bào các nhóm *V. cholerae* trong mẫu, trong khi đó DNA của mỗi chủng *V. cholerae* sau khi tăng sinh vẫn không thể đại diện cho quần thể nhóm vi khuẩn này trong mẫu xét nghiệm. Do đó để tầm soát các yếu tố độc lực của *V. cholerae* trong sản phẩm thủy hải sản, các phòng thí nghiệm giám sát nên sử dụng DNA tách chiết trực tiếp từ dung dịch tăng sinh mẫu xét nghiệm hơn là chọn khuẩn lạc.

Bảng 5. Kết quả phát hiện gen độc lực của *V. cholerae*

Các gen đích sử dụng	Dịch tăng sinh ($n = 86$ mẫu)		TCBS ($n = 39$ gốc)		CAV ($n = 76$ gốc)	
	n	%	n	%	n	%
<i>ctxA</i> + <i>rfbO1</i> + <i>rfbO139</i>	2	2,33	0	0,00	0	0,00
<i>ctxA</i> + <i>rfbO1</i>	5	5,81	0	0,00	2	2,63
<i>ctxA</i> + <i>rfbO139</i>	7	8,14	3	7,69	4	5,26
<i>rfbO1</i>	3	3,49	1	2,56	3	3,95
<i>rfbO139</i>	4	4,65	2	5,13	5	6,58
<i>ctxA</i>	5	5,81	0	0,00	2	2,63

3.4. Kết quả phát hiện các gen độc lực của *V. parahaemolyticus*

Tỷ lệ phát hiện gen *tdh* từ DNA của dịch tăng sinh mẫu là 25,74% cao hơn các chủng phân lập (20,29% từ TCBS và 16,10% từ CAV), trong khi đó 100% mẫu tăng sinh lẫn các chủng phân lập đều sở hữu gen *tlh*.

Kết quả Bảng 6 cho thấy sử dụng DNA ly trích trực tiếp từ dịch tăng sinh phát hiện

đồng thời hai gen *tlh* và *tdh* cao hơn so với các chủng định danh bằng sinh hóa. Tuy nhiên, khả năng phát hiện đồng thời hai gen *tlh* và *tdh* từ hai môi trường phân lập thì môi trường CAV lại thấp hơn môi trường TCBS (16,10% so với 20,29%).

Bảng 6. Kết quả phát hiện gen độc lực của *V. parahaemolyticus*

Các gen đích sử dụng	Dịch tăng sinh (n = 136 mẫu)		TCBS (n = 69 gốc)		CAV (n = 118 gốc)	
	n	%	n	%	n	%
<i>tlh + tdh</i>	35	25,74	14	20,29	19	16,10
<i>tlh</i>	136	100	69	100	118	100

4. KẾT LUẬN

Đối với phương pháp truyền thống sử dụng môi trường CAV thì tỷ lệ phát hiện *V. cholerae* và *V. parahaemolyticus* cao hơn môi trường TCBS. Tuy nhiên, so với phương pháp m-PCR thì phương pháp truyền thống sử dụng cả hai môi trường phân lập TCBS và CAV cho tỷ lệ phát hiện *V. parahaemolyticus* và *V. cholerae* thấp hơn. Phản ứng m-PCR 2 và 3 phát hiện được nhiều gen độc lực với tỷ lệ cao từ DNA của dịch tăng sinh mẫu so với DNA từ các chủng phân lập trên TCBS hoặc CAV. Phản ứng m-PCR3 phát hiện được 100% mẫu tăng sinh lẫn các chủng đều sở hữu gen *tlh*. Như vậy DNA tách chiết từ dung dịch tăng sinh mẫu đã sở hữu nhiều gen độc lực với tỷ lệ cao hơn so với DNA của các chủng phân lập.

Vibrio cholerae in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2849-2855.

2. Bej A. K., Patterson D. P., Brasher C. W., Vickery M. C. L., Jone D. D., Kaysner C. A., (1999) Detection of the total and hemolysin - producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplifications of *tl*, *tdh* and *trh*, *Journal of Microbiological Methods*, 36, 215-225.

3. Tarr C. L., Patel S. J., Puhr N. D., Sowers E. G., Bopp C. A., Strockbine N. (2007) A., Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination, *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 134-140.

ISO/TS 21872-1:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. - Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*

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., Colwell R. R., (2006) Toxigenic