

ĐẶC ĐIỂM SINH HÓA VÀ DI TRUYỀN CỦA CHỦNG *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN THẬN CHO CÁ MÚ NUÔI TẠI CÁT BÀ, HẢI PHÒNG

Vũ Thị Bích Huyền¹, Nguyễn Xuân Việt¹,
Phạm Thị Tâm², Huỳnh Việt Tùng¹, Mẫn Hồng Phước³

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan thận cho nhiều loài cá biển có giá trị kinh tế cao. Từ những mẫu cá mú mắc bệnh thu thập ở Cát Bà, Hải Phòng, đã phân lập được 6 mẫu vi khuẩn có hình thái, đặc điểm sinh hóa đặc trưng cho chủng *V. parahaemolyticus*. 6 mẫu vi khuẩn này đều có tính kháng với 5 loại kháng sinh nghiên cứu, đặc biệt có tính kháng cao với ampicillin. Tỷ lệ sống sót của cá mú chấm cam (*Epinephelus coioides*) sau 14 ngày gây nhiễm với 6 mẫu vi khuẩn là từ 2,2% đến 18,89% ở liều 100 µl/con, 10⁷ CFU/ml. Khi phân tích sự có mặt của các gen độc tố haemolysin, đã phát hiện được sự có mặt của 2 gen độc tố *toxR* và *tlh* trên cả 6 mẫu vi khuẩn. Gen *tdh* và *trh* không được phát hiện trong hệ gen của 6 mẫu vi khuẩn phân lập. Đã khuếch đại được trình tự gen *toxR* và *tlh* hoàn chỉnh với kích thước gen tương ứng lần lượt là 879 bp và 1254 bp với hai cặp mồi *toxR2- toxR4* và *tlh1-tlh3* tự thiết kế. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở cho những nghiên cứu về đột biến gen, về cấu trúc không gian, cơ chế gây bệnh của những protein được mã hóa từ 2 gen độc tố này.

Từ khóa: *Vibrio parahaemolyticus*, bệnh hoại tử gan thận, cá mú, gen *tlh*, gen *toxR*.

Genetic and biochemical characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* caused hepatic kidney necrosis disease in groupers raising in Cat Ba, Hai Phong

Vu Thi Bich Huyen, Nguyen Xuan Viet,
Pham Thi Tam, Huynh Viet Tung, Man Hong Phuoc

SUMMARY

Vibrio parahaemolyticus bacteria causes hepatic kidney necrosis disease in several marine fish species having highly economic value. From a number of the diseased groupers collecting in Cat Ba, Hai Phong, 6 bacterial strains having typically morphological and biochemical characteristics of *V. parahaemolyticus* species were identified. All these 6 bacterial strains resisted to 5 studied antibiotics, particularly resisted strongly to ampicillin. The survival rate of *Epinephelus coioides* (orange spot grouper) after 14 days of experimental infection with 6 bacterial strains was 2.2% to 18.89% at dose of 100 µl/fish, 10⁷ CFU/ml. The result of analyzing the presence of haemolysin virulent genes showed that there were 2 *toxR* and *tlh* genes in all 6 isolated strains. The *tdh* and *trh* genes were not detected in genome of 6 isolated strains. The full sequences of *toxR* and *tlh* genes were amplified with the corresponding sizes were 879 bp and 1254 bp with 2 self-design primers (*toxR2- toxR4* and *tlh1-tlh3*). This studied result is basis for the further researches on gene mutation, space structure, pathogen mechanisms of proteins coding from 2 these toxicity genes.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, hepatic kidney necrosis disease, grouper, gene *tlh*, gene *toxR*.

¹ Đại học Sư phạm Hà Nội

² Viện Đại học Mở Hà Nội

³ Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học công nghệ Việt Nam

I. MỞ ĐẦU

Vibrio parahaemolyticus là nguyên nhân gây bệnh cho nhiều loài động vật thủy sản, đặc biệt là bệnh hoại tử gan thận ở cá biển. Nó được báo cáo gây bệnh trên 48 loài cá biển ở 14 quốc gia trên thế giới [1]. Cá mú là loài cá biển có giá trị kinh tế cao ở nước ta. Khi mắc bệnh hoại tử gan thận, cá sẽ có triệu chứng da chuyển sẫm màu, đốm đỏ xuất hiện trên thân và phát triển thành vết loét rộng, xuất huyết ở vây, hậu môn, đuôi; cụt vây đuôi, gan nhợt nhạt, thận đen bầm, có thể tích dịch trong xoang bụng, cá bị chết hàng loạt với tỷ lệ 75% - 90% [2, 3]. *V. parahaemolyticus* là vi khuẩn Gram âm, có khả năng lên men glucose, không lên men lactose, không sinh H_2S , không sinh khí, sinh catalase, sinh indole, có khả năng di động, khả năng dung huyết dạng β (β -haemolysin) [4].

Haemolysin là ngoại độc tố của *V. parahaemolyticus*, là nguyên nhân gây bệnh cho vật chủ. Chúng có khả năng bám lên màng hồng cầu, gây thủng màng và giải phóng haemoglobin, tạo ra hiện tượng dung huyết dạng β (β -haemolysin). Haemolysin không chỉ xâm nhập hồng cầu mà còn tấn công các tế bào biểu mô, tế bào thần kinh, một số tế bào đa nhân làm tăng cường độc tố và gây phá hủy các mô của vật chủ. Bốn gen *tdh*, *trh*, *tlh* và *toxR* là những gen có liên quan đến độc tố haemolysin. Trong đó, *tdh* mã hóa TDH (thermostable direct haemolysin), *trh* mã hóa TRH (TRH-related haemolysin) và *tlh* mã hóa TLH (thermolabile haemolysin) [5] và *toxR* mã hóa protein tham gia điều hòa hoạt động của gen *tdh* và một số gen mã hóa protein màng [6]. Trình tự *toxR* có tính bảo tồn cao, thường được sử dụng để định danh *V. parahaemolyticus* trong mẫu thủy sản bằng kỹ thuật PCR [7].

Gen độc tố có vai trò quan trọng trong quá trình gây độc cho vật chủ. Do đó, việc xác định được cấu trúc, trình tự gen độc tố làm cơ sở để xây dựng được cấu trúc không gian của protein hay những nghiên cứu về đột biến gen

độc tố là vô cùng cần thiết. Căn cứ vào kết quả của những nghiên cứu này, có thể phát triển thuốc, vaccin để chống lại vi khuẩn gây bệnh. Gen *toxR* được phát hiện nhờ cặp mồi *toxR*-4 5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3'; *toxR*-7 R-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG với sản phẩm có kích thước 368 bp [8-10]. Tuy nhiên, khi phân tích hệ gen được giải trình tự hoàn chỉnh, chúng tôi nhận thấy trình tự được khuếch đại (368 bp) chưa phải một trình tự gen *toxR* hoàn chỉnh. Đây chỉ là một đoạn thuộc khung đọc mở (ORF) bắt đầu từ mã mở đầu đến mã kết thúc của gen *toxR*. Trình tự hoàn chỉnh của *toxR* ở *V. parahaemolyticus* là 879 bp. Tương tự, gen *tlh* có trình tự amino acid bảo thủ đặc trưng cho Vibrionaceae, được khuếch đại với sản phẩm PCR có kích thước 450 bp bằng cặp mồi *tlhF* 5'-AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG-3'; *tlhR* 5'-GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGCG-3' [8, 11, 12]. Nhưng trên hệ gen đã được công bố của *V. parahaemolyticus*, nhận thấy ORF của gen *tlh* là 1254 bp mã hóa cho 417 amino acid [13] và trình tự 450 bp là một đoạn trình tự thuộc ORF của gen *tlh*. Tính đến thời điểm hiện tại, chưa có báo cáo về việc thiết kế, sử dụng cặp mồi để khuếch đại kích thước hoàn chỉnh của 2 gen *toxR* và *tlh* ở *V. parahaemolyticus*.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá đặc điểm sinh hóa và xác định các gen độc tố với kích thước hoàn chỉnh của chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập từ cá mú bị bệnh hoại tử gan thận nuôi tại Cát Bà, Hải Phòng. Kết quả nghiên cứu cung cấp cơ sở dữ liệu về đặc điểm của chủng *V. parahaemolyticus* phân lập từ cá bệnh ở Hải Phòng. Đây cũng là báo cáo đầu tiên về phân lập gen độc tố *toxR* và *tlh* với kích thước hoàn chỉnh ở *V. parahaemolyticus*.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Cá bị bệnh: Cá mú được thu thập ở vùng nuôi cá khu vực Cát Hải, Hải Phòng có các

triệu chứng mắc bệnh hoại tử gan thận bao gồm xuất hiện vết loét, xuất huyết ở vây, cụt vây, cụt đuôi, gan nhợt nhạt, thận đen bầm. Số lượng cá mủ được thu thập là 15 mẫu, được thu thập trong tháng 6, 7 năm 2016.

Cá thí nghiệm: Cá mủ chấm cam (*Epinephelus coioides*) dài 5,5 - 6 cm do Trung tâm Giống thủy sản (Hải Phòng) cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập từ cá bị bệnh hoại tử gan thận

Mô bệnh (gan, thận, da lở loét, vây đuôi bị cụt) được nghiền nhỏ trong dung dịch NaCl 1,5%, tạo dịch huyền phù. Pha loãng dung dịch, lấy 100 μ l từ dịch pha loãng ở nồng độ 10^{-5} , 10^{-6} cấy trải trên TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose; Titan Biotech, India). Vi khuẩn được nuôi ở 27°C, trong 24 giờ. Chọn lọc khuẩn lạc có màu xanh, tròn, bóng, đường kính 2,0 - 4,0 mm.

2.2.2. Đánh giá đặc điểm hóa sinh và tính kháng kháng sinh của vi khuẩn

Các mẫu vi khuẩn chọn lọc được nhuộm Gram và đánh giá đặc tính sinh hóa của vi khuẩn bao gồm khả năng lên men, sinh indol, sinh catalase, khả năng di động, sinh khí, sinh H_2S và khả năng gây dung huyết theo phương pháp của Trần Linh Phước (2009) [14].

Vi khuẩn được cấy trải trên môi trường BHI với 5 đĩa giấy tẩm kháng sinh: ampicillin (25 μ g), gentamycin (30 μ g), norfloxacin (10 μ g), enrofloxacin (5 μ g) và erythromycin (15 μ g) (Mast Diagnostics, England) đặt trên bề mặt môi trường. Nuôi vi khuẩn ở 28°C, sau 48 giờ, đánh giá đường kính vòng vô khuẩn theo Clinical and Laboratory (CLSI) (2006) với đường kính vòng vô khuẩn (D) ≥ 20 mm: mẫn cảm (S), D = 15-19 mm: mẫn cảm trung bình (I); D < 14 mm: kháng kháng sinh (R) [15].

2.2.3. Gây nhiễm vi khuẩn cho cá mủ

Cá mủ khỏe mạnh được nuôi trong nước

biển tự nhiên tại phòng thí nghiệm Đại học Sư phạm Hà Nội trong 2 tuần để thích nghi với điều kiện môi trường. Tiến hành tiêm 100 μ l/con dịch khuẩn vào phúc mạc dưới da của cá theo phương pháp của Paranjpye R.N. và cộng sự (2013) với nồng độ 10^7 CFU/ml [16]. Cá tiêm dung dịch phosphate buffered saline (PBS) được sử dụng làm mẫu đối chứng. Sau 24 giờ gây nhiễm, bắt đầu ghi nhận tỷ lệ sống sót của cá trong 14 ngày sau tiêm. Mỗi lô thí nghiệm 30 con, thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Tỷ lệ sống sót (%) = (số lượng cá sống sót / số lượng cá thí nghiệm) x 100

Số liệu được xử lý thống kê trên Excel và phần mềm Stata 2.0

2.2.4. Thiết kế môi, tách DNA, PCR khuếch đại các gen độc tố và giải trình tự gen độc tố

Sử dụng phần mềm CLC Genomics Workbench 11.0 (QIAGEN Bioinformatics) thiết kế cặp mồi khuếch đại gen *toxR*, *tlh* dựa trên trình tự genome đã công bố của *V. parahaemolyticus* FORC_008 [13]. DNA tổng số của các vi khuẩn được tách bằng kit i-Genomic BYF DNA Extraction Mini (iNtRON, Hàn Quốc). Phản ứng PCR với thể tích 20 μ l: 2 μ l DNA khuôn; 10 μ l 2x PCR Master mix Solution (iNtRON, Hàn Quốc); 1,5 μ l mỗi mồi (bảng 1) và 5 μ l dH_2O . Phản ứng PCR với pha đầu ở 94°C trong 5 phút, 40 chu kỳ gồm 3 giai đoạn lần lượt ở 94°C trong 50 giây, 52 – 60°C trong 30 giây (tùy từng mồi), 72°C trong 90 giây, và pha cuối 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%.

Sản phẩm PCR các gen độc tố của 3 vi khuẩn được gửi giải trình tự tại First BASE Laboratories, Lot. 7-1 to 7-4, Jalan SP 2/7, Taman Serdang Perdana, Seksyen 2, 43300 Seri Kembangan, Selangor, Malaysia. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm CLC Genomics Workbench 11.0 và công cụ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

Bảng 1. Trình tự các môi khuếch đại gen độc tố

Gen đích	Môi	Trình tự môi (5' – 3')	Tm (°C)	Kích thước sản phẩm (bp)	Nguồn
<i>toxR</i>	toxR-4	GTCTTCTGACGCAATCGTTG	54,1	368	Kim Y.B. &cs (1999) [17]
	toxR-7	ATACGAGTGGTTGCTGTCATG	55,0		
<i>toxR</i>	toxR2	ACTCTACCCCCCTAAAAGCA	55,5	1070	Tự thiết kế
	toxR4	CTGCCCCAGTACAACCAACC	58,5		
<i>tlh</i>	tlhF	AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	58,0	450	Bej A.K. &cs (1999) [12]
	tlhR	GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGCG	56,1		
<i>tlh</i>	tlh1	TGTCGTGGCCATTTTGCTT	55,7	1484	Tự thiết kế
	tlh3	CCGTGATGCCAAAATCAAAA	52,0		
<i>tdh</i>	tdhF	GTAAAGGTCTCTGACTTTTGAC	53,3	269	Bej A.K. &cs (1999) [12]
	tdhR	TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC	54,5		
<i>trh</i>	trhF	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	52,2	500	Bej A.K. &cs (1999) [12]
	trhR	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	52,8		

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và đánh giá đặc điểm sinh hóa, tính kháng kháng sinh của vi khuẩn

Từ cá mú nghi mắc bệnh hoại tử gan thận, tiến hành phân lập vi khuẩn trên môi trường TCBS, chọn lọc 6 mẫu vi khuẩn có hình thái khuẩn lạc phù hợp với *V. parahaemolyticus*: khuẩn lạc màu xanh đậm, tròn đều, bóng, đường kính từ 2,5 - 4 mm (hình 1a) và là vi khuẩn Gram âm. TCBS là môi trường chọn lọc cho các chủng thuộc nhóm *Vibrio*, cho phép phân biệt chủng *Vibrio* có sử dụng đường sucrose và chủng *Vibrio* không sử dụng đường sucrose [18]. Sự acid hóa của môi trường do quá trình lên men sucrose ở các vi khuẩn làm bryothymol blue (thành phần có trong TCBS) từ màu xanh chuyển thành màu

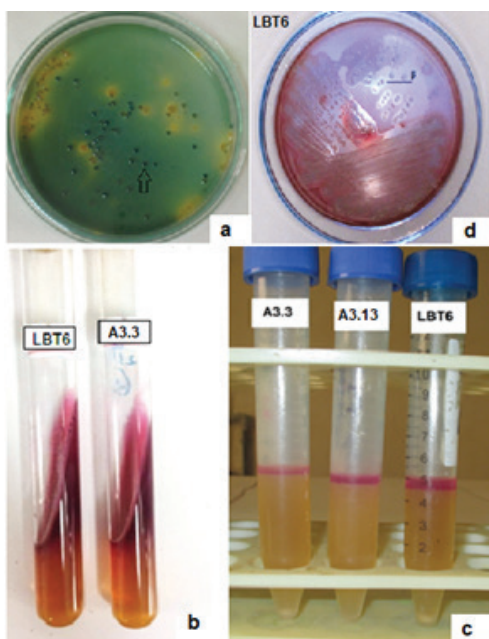
vàng. *V. parahaemolyticus* không có khả năng lên men sucrose, do đó khuẩn lạc của nó sẽ có màu xanh trên môi trường TCBS.

Sáu mẫu vi khuẩn phân lập được đánh giá về một số đặc điểm sinh hóa (bảng 2, hình 1). Kết quả cho thấy 6 mẫu vi khuẩn phân lập được đều có đặc điểm sinh hóa phù hợp với chủng *V. parahaemolyticus*: khả năng lên men đường glucose, không lên men lactose, không sinh khí và không sinh H₂S khi được nuôi cấy trên môi trường KIA (Kingler Iron Agar) (hình 1b); có khả năng di động; khả năng sinh indol (hình 1c); khả năng sinh catalase và khả năng dung huyết dạng β (hình 1d). Như vậy, bước đầu có thể khẳng định 6 mẫu vi khuẩn phân lập được thuộc chủng *V. parahaemolyticus*.

Bảng 2. Đặc điểm sinh hóa của 6 mẫu vi khuẩn phân lập

STT	Chủng	Lên men		Di động	Sinh indol	Catalase	Dung huyết β	Sinh H ₂ S	Sinh gas
		Glucose	Lactose						
1	A2.6	+	-	+	+	+	+	-	-
2	A3.3	+	-	+	+	+	+	-	-
3	A3.13	+	-	+	+	+	+	-	-
4	LBT6	+	-	+	+	+	+	-	-
5	Vp67.1	+	-	+	+	+	+	-	-
6	Vp6.2	+	-	+	+	+	+	-	-

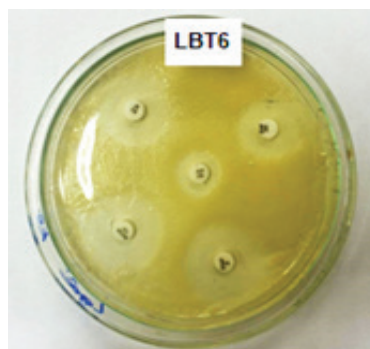
Ghi chú: (+) dương tính; (-) âm tính.



Hình 1. Khảo sát đặc điểm sinh hóa của mẫu phân lập

a. Khuẩn lạc màu xanh mọc trên môi trường TCBS; b. Vi khuẩn lên men glucose trên môi trường KIA; c. Vi khuẩn sinh indol phản ứng với thuốc thử Kovac cho màu hồng; d. Vi khuẩn mọc trên môi trường thạch máu gây dung huyết hồng cầu.

Đánh giá tính kháng kháng sinh của 6 mẫu vi khuẩn phân lập với 5 kháng sinh được mô tả tại bảng 3 và hình 2. Kết quả này cho thấy 6 mẫu vi khuẩn đều có tính kháng với các loại kháng sinh nghiên cứu. Đặc biệt là đối với kháng sinh ampicillin (25 µg), 6/6 chủng đều có tính kháng cao với loại kháng sinh này.



Hình 2. Vi khuẩn LBT6 trên BHI agar với 5 đĩa giấy kháng sinh

Điều này có thể được lý giải do người nuôi cá tại khu vực Cát Bà có thể đã sử dụng kháng sinh một cách thường xuyên và không được kiểm soát để điều trị các bệnh cho cá nuôi lồng.

Bảng 3. Đặc tính kháng 5 loại kháng sinh của 6 mẫu vi khuẩn

STT	Chủng vi khuẩn	Tính kháng kháng sinh				
		Erythromycin (15 µg)	Gentamycin (30 µg)	Norfloxacin (10 µg)	Ampicillin (25 µg)	Enrofloxacin (5 µg)
1	A2.6	R	I	R	R	R
2	A3.3	I	I	I	R	I
3	A3.13	R	R	S	R	I
4	LBT6	R	R	R	R	I
5	Vp67.1	R	R	I	R	S
6	Vp6.2	R	R	I	R	I

Ghi chú: S - mẫn cảm; I – mẫn cảm trung bình; R - kháng

Zulkifli Y. và cộng sự (2009) cũng cho rằng các vi khuẩn được phân lập từ những nguồn mẫu thường xuyên sử dụng kháng sinh sẽ có tính kháng cao đồng thời với nhiều loại kháng sinh. Đánh giá trên 31 mẫu vi khuẩn phân lập mà nhóm

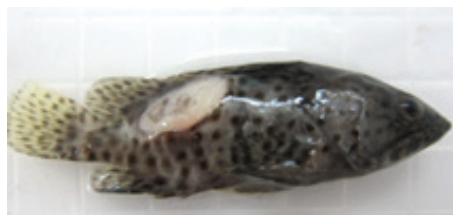
tác giả phân lập chỉ số đa kháng MAR (multiple antibiotic resistance index) từ 0,31 đến 0,69 với 16 loại kháng sinh [19]. Xu X. và cộng sự (2016) đánh giá tính kháng kháng sinh của 145 mẫu vi khuẩn với 12 loại kháng sinh và tỷ lệ

kháng được ghi nhận ở streptomycin 86,2%; ampicillin 49,6%; cefazolin 43,5%; cephalothin 35,9% và kanamycin 22,1% [20]. Từ thực trạng nói trên nhận thấy những giải pháp để hạn chế việc sử dụng kháng sinh một cách không kiểm soát ở những khu vực nuôi các động vật thủy sản là hết sức cần thiết.

3.2. Đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn phân lập

Cá mú khỏe mạnh sau khi bị gây nhiễm với 6 chủng *V. parahaemolyticus* ở liều 100µl/con, 10⁷CFU/ml xuất hiện các triệu chứng mắc bệnh: xuất huyết gốc vây, vây cụt, tuột vây, tuột nhớt, loét da quanh khu vực tiêm, màu da thay đổi

đậm hơn (hình 3). Gan và thận của cá bị hoại tử nghiêm trọng. Phân lập lại từ các mẫu cá bị chết thì 100% mẫu phát hiện *V. parahaemolyticus*. Tỷ lệ sống sót của cá được ghi nhận sau 14 ngày gây nhiễm được thể hiện ở bảng 4.



Hình 3. Cá mú chết sau khi bị gây nhiễm với vi khuẩn LBT6

Bảng 4. Tỷ lệ sống sót của cá mú sau gây nhiễm với 6 mẫu vi khuẩn

Chủng	Tỷ lệ sống sót của cá sau ngày gây nhiễm (%)							
	Ngày 1	Ngày 3	Ngày 5	Ngày 7	Ngày 9	Ngày 11	Ngày 13	Ngày 14
A2.6	81,18 ±1,70	53,33 ±1,24	35,57 ±0,47	14,44 ±0,47	7,86 ±0,47	6,67 ±0,00	6,67 ±0,00	6,67 ^{ab} ±0,00
A3.3	78,89 ±0,67	70,00 ±0,00	48,89 ±0,47	31,11 ±0,47	13,33 ±0,00	11,11 ±0,47	11,11 ±0,47	10,00 ^{ab} ±0,00
A3.13	55,56 ±0,47	27,78 ±0,82	17,78 ±0,47	13,33 ±0,00	11,11 ±0,47	4,44 ±0,47	2,22 ±0,47	2,22 ^a ±0,47
LBT6	82,22 ±1,25	55,56 ±0,47	28,89 ±0,47	17,78 ±0,47	13,33 ±0,00	14,44 ±0,47	13,33 ±0,82	13,33 ^{ab} ±0,47
Vp67.1	85,56 ±0,47	67,78 ±0,47	45,56 ±0,47	33,33 ±0,00	22,22 ±1,25	20,00 ±0,82	18,89 ±0,47	18,89 ^b ±0,47
Vp6.1	74,44 ±1,25	53,33 ±1,24	38,89 ±0,94	28,89 ±0,82	20,00 ±1,24	18,89 ±0,47	17,78 ±0,47	16,67 ^{ab} ±0,00
PBS	100	100	100	100	100	100	100	100 ^c

Ghi chú: chữ cái a, b, c thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p < 0,05$

Tỷ lệ sống sót của cá 14 ngày sau gây nhiễm (bảng 4) dao động từ 2,22% đến 18,89%, trong đó, tỷ lệ cá sống sót thấp nhất (2,22%) ở cá được gây nhiễm với A3.13, cao nhất (22,22%) ở cá được gây nhiễm với Vp67.1. Tỷ lệ sống sót của cá giảm nhanh ở tuần đầu tiên và có xu hướng giảm chậm ở tuần tiếp theo sau khi gây nhiễm. Điều này phù hợp với đặc điểm gây bệnh của *V. parahaemolyticus*, nó có thể làm cá chết hàng loạt khi ở thể cấp tính hoặc chết rải rác khi cá ở thể thứ cấp tính [2, 21]. Nguyễn Thị Thanh

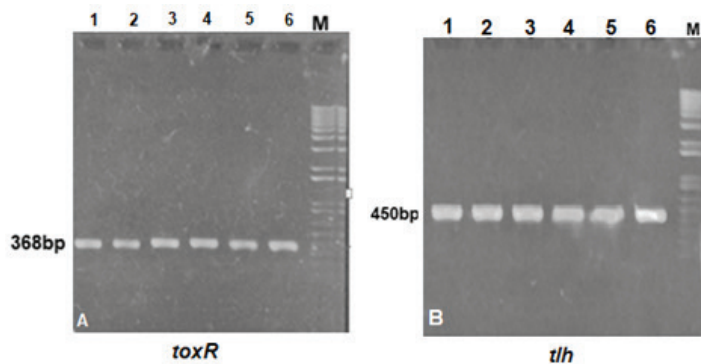
Thủy và cộng sự (2012) cũng xác định tỷ lệ chết của cá mú chấm cam bị gây nhiễm bởi chủng *V. parahaemolyticus* A và V3 lần lượt là 90%; 91,7% [2], tương đương với tỷ lệ sống sót của cá là 10% và 9,3%. Trên một đối tượng khác, cá hồng bạc (*Sparus sarba*), Li.J và cộng sự (1999) báo cáo tỷ lệ sống sót của cá là 0% với việc gây nhiễm *V. parahaemolyticus* ở liều lượng 100 µl/con và 10⁸ CFU/ml, 100% cá đều có hiện tượng xuất huyết và lở loét da [22]. Có thể nhận thấy, vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* có khả năng

gây bệnh và làm cá chết với tỷ lệ chết rất cao.

3.3. Phát hiện sự có mặt các gen độc tố của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập

DNA tổng số của 6 mẫu vi khuẩn được tách, điện di trên gel agarose 1,5% cho bằng sắc gọn, rõ nét, đủ tiêu chuẩn để làm PCR. Bốn cặp mồi *toxR*-4, *toxR*-7 (Kim Y.B. &cs, 1999) [17]; *tlhF*-*tlhR*; *tdhF*-*tdhR* và *trhF*-*trhR* (Bej A.K. &cs, 1999) [12] được sử dụng để phát hiện sự có mặt của các gen độc tố *toxR*, *tlh*, *tdh* và *trh* trong hệ gen của 6 mẫu vi khuẩn đã

phân lập. Kết quả cho thấy, phát hiện được 2 gen *toxR* và *tlh* với kích thước sản phẩm PCR 368 bp và 450 bp ở cả 6 mẫu nghiên cứu (hình 4). Giải trình tự 2 sản phẩm này ở 3 mẫu vi khuẩn A3.3; A3.13 và LBT6 và phân tích trên BLAST cho tỷ lệ tương đồng 99% với hàng chục chủng *V. parahaemolyticus* trên NCBI. Kết quả này khẳng định 6 mẫu vi khuẩn phân lập được thuộc *V. parahaemolyticus*. Sau đây, 6 mẫu vi khuẩn phân lập sẽ được gọi là chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.



Hình 4. Điện di sản phẩm PCR gen *toxR* và *tlh* của 6 mẫu vi khuẩn
Ghi chú: giếng 1-6: A2.6; A3.3; A3.13; LBT6; Vp67.1; Vp6.1; M: Marker 100bp

Đối với gen *tdh* và *trh*, không phát hiện được 2 gen này trong hệ gen của 6 chủng vi khuẩn phân lập. Ilida và cộng sự (1997) cũng cho rằng không phải tất cả các chủng *V. parahaemolyticus* đều mang gen *tdh*, *trh* [23]. Chỉ 1 - 5% số lượng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* mang gen *tdh*, *trh* [24]. Xie Z.Y. và cộng sự (2005) xác định trong 8 chủng vi khuẩn phân lập từ các động vật thủy sản ở Quảng Tây (Trung Quốc) đều phát hiện cả 2 gen *tdh* và *trh* trong hệ gen [25]. Trong 23 mẫu vi khuẩn phân lập từ các nguồn động vật thủy sản khác nhau, chỉ có 1/23 mẫu phân lập chứa gen *trh* và không phát hiện được gen *tdh* ở tất cả các mẫu vi khuẩn [26]. Tại Việt Nam, Nguyễn Văn Duy và cộng sự (2012) phân lập được 5 chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* từ các mẫu hải sản tươi sống ở Nha Trang và đều không phát hiện được sự có mặt của hai gen *tdh* và *trh* trong hệ gen của chúng [27]. Như vậy, mặc dù

chỉ có một gen mã hóa độc tố haemolysin (*tlh*) trong hệ gen, các chủng vi khuẩn phân lập trong nghiên cứu này vẫn có khả năng gây bệnh với tỷ lệ chết cao cho cá mú thí nghiệm.

3.4. Xác định kích thước gen *toxR*, *tlh* ở chủng *Vibrio parahaemolyticus* phân lập

3.4.1. Gen *toxR*

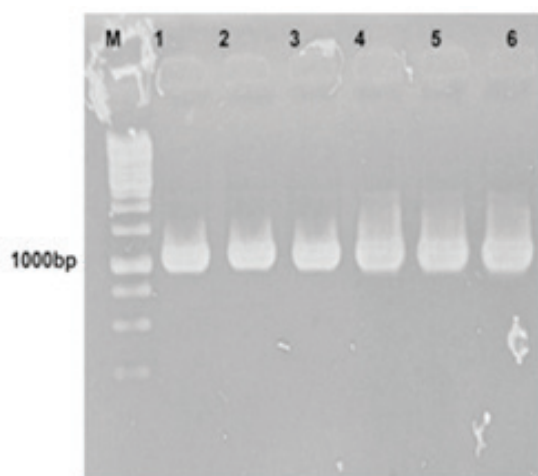
Sử dụng cặp mồi *toxR*2-*toxR*4 (tự thiết kế) khuếch đại gen *toxR* cho sản phẩm có kích thước 1000 bp ở tất cả 6 chủng vi khuẩn (hình 5a). Sản phẩm này ở 3 chủng: A3.3; A3.13 và LBT6 được giải trình tự và phân tích bằng công cụ BLAST. Mức độ tương đồng của các trình tự này so với trình tự ở hàng chục chủng khác thuộc loài *V. parahaemolyticus* rất cao, 99% (bảng 5). Như vậy, cặp mồi *toxR*2-*toxR*4 được thiết kế là đặc hiệu, khuếch đại chính xác gen *toxR* của chủng *V. parahaemolyticus*.

Bảng 5. So sánh trình tự gen *toxR* của chủng *V. parahaemolyticus* LBT6 với các trình tự trên NCBI bằng công cụ BLAST

STT	Chủng	Tổng số điểm	Tỷ lệ che phủ (%)	Giá trị kỳ vọng	Độ tương đồng (%)	Số hiệu gen
1	<i>V. parahaemolyticus</i> CDC_K4557	1618	100	0,0	99,89	CP006008.1
2	<i>V. parahaemolyticus</i> BB22OP	1618	100	0,0	99,89	CP003972.1
3	<i>V. parahaemolyticus</i> R13	1591	100	0,0	99,32	CP028342.1
.....						
50	<i>V. parahaemolyticus</i> Y-27669	1546	100	0,0	99,00	AB029910.1
.....						
100	<i>V. parahaemolyticus</i> 1937	937	61	0,0	98,68	KM036063.1

Khi so sánh trình tự *toxR* (~ 368 bp) được khuếch đại với cặp mồi *toxR*-4, *toxR*-7 và trình tự *toxR* (879 bp) được khuếch đại với cặp mồi *toxR*2- *toxR*4 của 3 chủng A3.3; A3.13 và LBT6 trên CLC Genomics Workbench 11.0 nhận thấy:

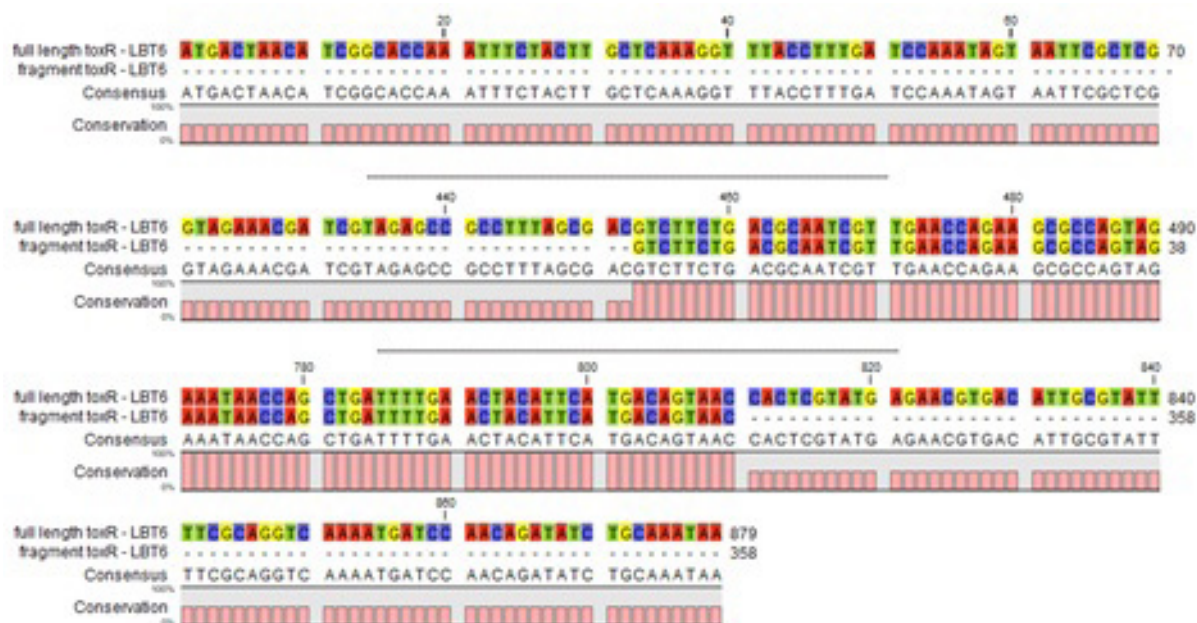
(1) Trình tự gen *toxR* (879 bp) bao trùm trình tự *toxR* (~ 368 bp) từ vị trí nucleotide 453 đến nucleotide 810 (hình 6); (2) trình tự *toxR* (~ 368 bp) có tỷ lệ tương đồng tới 100% khi so sánh với đoạn trình tự tương ứng trên *toxR* (879 bp).



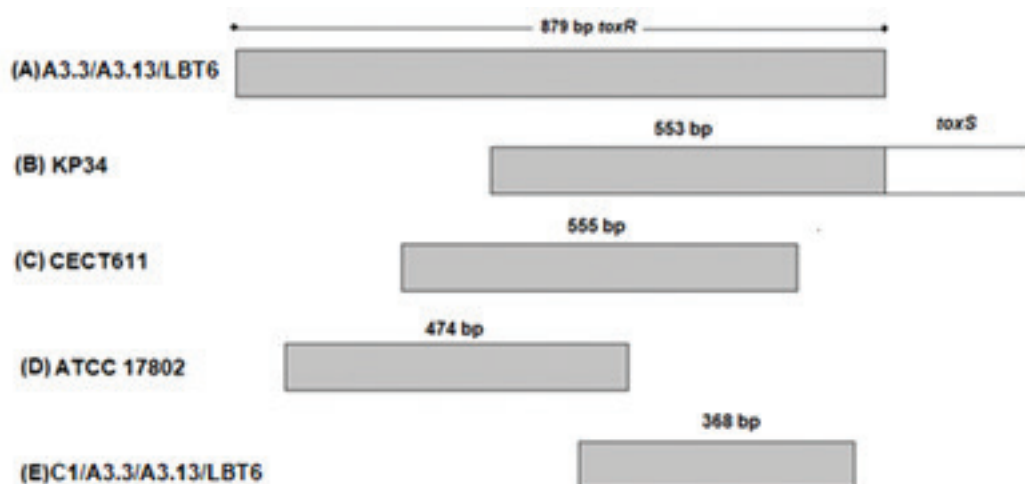
Hình 5. Điện di sản phẩm PCR gen *toxR* và *tliH* của 6 chủng với cặp mồi tự thiết kế
 Ghi chú: giếng 1-6: A2.6; A3.3; A3.13; LBT6; Vp67.1; Vp6.1; M: Marker 1 kb

Ngoài trình tự 368 bp [27, 28], một số trình tự: 474 bp [29]; 528 bp [30]; 555 bp được khuếch đại bằng PCR với các cặp mồi khác nhau [31] cũng được công bố ở gen *toxR*. Tiến hành so sánh các trình tự này với trình tự gen *toxR* (879 bp) của 3 chủng A3.3, A3.13, LBT6 cho thấy các trình tự này là một đoạn trong trình tự gen *toxR* (hình 8) với mức độ tương đồng cao, 99%.

Như vậy, cặp mồi *toxR*2-*toxR*4 (được thiết kế) đã khuếch đại gen *toxR* với kích thước hoàn chỉnh 879 bp và sản phẩm PCR là 1000 bp. Với trình tự 879 bp, chuỗi polypeptide suy diễn từ gen *toxR* sẽ có kích thước 292 amino acid. Trình tự gen *toxR* của chủng A3.3 đã được đăng ký trên Genbank với số hiệu (accession number) là MH047286.



Hình 6. So sánh trình tự gen *toxR* chủng LBT6 được khuếch đại bởi 2 cặp mồi *toxR2-toxR4* (full length *toxR*-LBT6) và *toxR-4*, *toxR-7* (fragments *toxR*-LBT6)



Hình 7. So sánh chiều dài các đoạn trình tự gen *toxR* (màu xám) khuếch đại bằng PCR ở các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

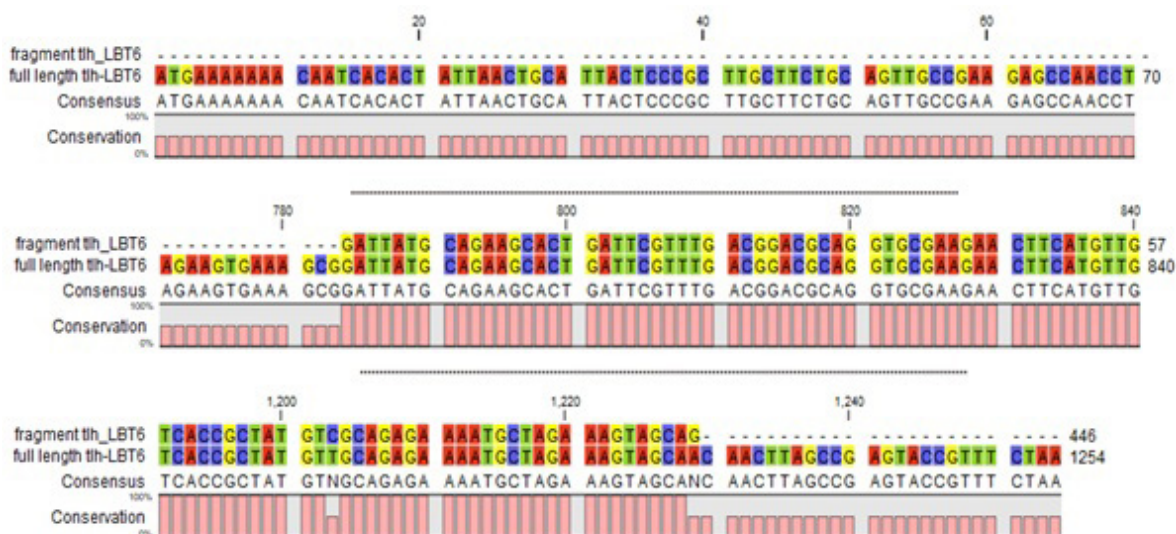
(A) Gen *toxR* hoàn chỉnh của chủng A3.3/A3.13/LBT6 được khuếch đại bởi cặp mồi *toxR2-toxR4*; (B) đoạn gen *toxR* và *toxS* của chủng KP34 với số hiệu DQ845170.1 [32] và các đoạn gen *toxR* của (C) chủng CECT611 với số hiệu FM202714.1 [31], (D) chủng ATCC 17802 với số hiệu GQ228073.1 [29], (E) chủng C1 với số hiệu JQ929913.1 [27] và chủng A3.3/A3.13/LBT6 được khuếch đại bởi cặp mồi *toxR-4*, *toxR-7*.

3.4.2. Gen *tlh*

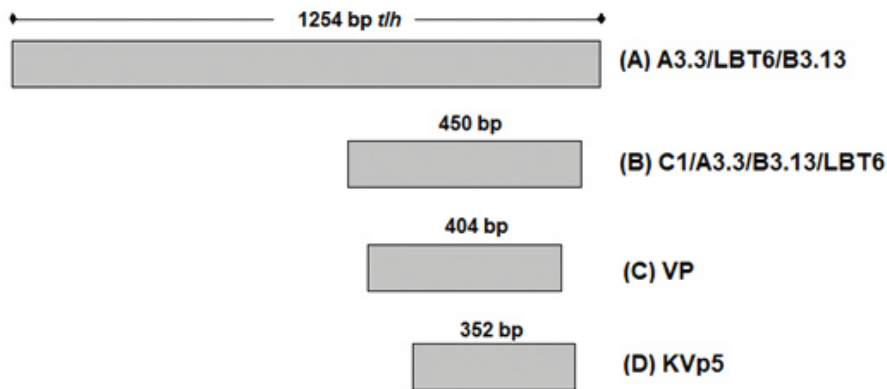
Cặp mồi *tlh1-tlh3* (tự thiết kế) được sử dụng để khuếch đại gen *tlh* có kích thước hoàn chỉnh với sản phẩm PCR là 1500 bp (hình 5b). Sản phẩm gen *tlh* ở 3 chủng A3.3, A3.13, LBT6 được giải trình tự và phân tích trình tự này (1254 bp) trên BLAST cho kết quả tương đồng cao (99%) với hàng chục chủng vi khuẩn thuộc loài *V. parahaemolyticus*. Trình tự gen *tlh* (1254 bp) khuếch đại bởi cặp mồi *tlh1-tlh3* được so sánh với trình tự *tlh* (450 bp) được khuếch đại với cặp mồi *tlhF-tlhR* ở 3 chủng A3.3; A3.13; LBT6 trên CLC Genomics Workbench 11.0. Hình 8 cho thấy trình tự *tlh* (450 bp) là một phần của trình tự gen *tlh* hoàn chỉnh (1254 bp) từ vị trí nucleotide 784 đến 1229 của chủng LBT6. Chủng A3.3 và A3.13 cũng cho kết quả tương tự.

Tiến hành so sánh trình tự *tlh* (1254 bp)

của chủng A3.3; A3.13 và LBT6 với các trình tự *tlh* được khuếch đại bằng PCR công bố trên Genbank với kích thước 450 bp [11]; 404 bp [25] hay 352 bp [33]. Kết quả cho thấy tỷ lệ tương đồng 99% giữa các chủng A3.3; A3.13; LBT6 với chủng *V. parahaemolyticus* C1; VP, KVp5 ở các vùng bao phủ tương ứng. So sánh về kích thước, sự bao phủ của các trình tự *tlh* được thể hiện tại hình 9. Các trình tự gen *tlh* được công bố trước đây chỉ là một phần của trình tự gen *tlh* hoàn chỉnh (1254 bp) xác định từ mã mở đầu đến mã kết thúc. Chuỗi polypeptide suy diễn từ gen *tlh* được xác định có kích thước 417 amino acid. Gen *tlh* của chủng A3.3 đã được đăng kí trên Genbank với mã số (accession number) là MH047289. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở cho những nghiên cứu về đột biến gen *tlh*; cấu trúc không gian của protein haemolysin TLH cũng như những cơ chế tác động của TLH với tế bào vật chủ.



Hình 8. So sánh trình tự gen *tlh* chủng LBT6 được khuếch đại bởi cặp mồi *tlh1-tlh3* (full length *tlh*-LBT6) và cặp mồi *tlhF-tlhR* (fragments *tlh*-LBT6)



Hình 9. Sơ đồ biểu diễn của các đoạn gen tlh do PCR khuếch đại (màu xám) ở các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

(A) gen tlh hoàn chỉnh của chủng A3.3/LBT6/A2.6 được khuếch đại bởi cặp mồi tlh1-tlh3 và đoạn gen tlh của (B) chủng C1 với accession number JQ929914.1 [27] và chủng A3.3/A2.6/LBT6 khuếch đại bởi cặp mồi tlhF-tlhR (C) chủng VP với accession number AY829372.1 [25] (D) chủng KVp5 với accession number HM195239.1 [33].

IV. KẾT LUẬN

Từ các mẫu cá mú nghi mắc bệnh hoại tử gan thận ở Cát Bà, Hải Phòng phân lập được 6 chủng vi khuẩn có hình thái, đặc điểm phù hợp với *V. parahaemolyticus*. Các vi khuẩn này đều là vi khuẩn gram âm, có khả năng lên men glucose, không lên men lactose, không sinh H_2S , không sinh khí, sinh indol, sinh catalase, có khả năng di động và làm tan huyết dạng β . Các chủng vi khuẩn này đều có khả năng gây bệnh trở lại cho cá mú chấm cam với tỷ lệ sống sót của cá từ 2,22% đến 18,89%. Phát hiện được 2 gen độc tố (*toxR* và *tlh*) trong hệ gen của 6 chủng vi khuẩn. Hai gen này đã được khuếch đại với trình tự hoàn chỉnh 879 bp (gen *toxR*) và 1254 bp (gen *tlh*) với 2 cặp mồi tự thiết kế (*toxR2-toxR4*; *tlh1-tlh3*).

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với kinh phí đề tài trọng điểm cấp Viện Đại học Mở Hà Nội (mã số: V2018.01-01) và đề tài cấp trường Đại học Sư phạm Hà Nội (mã số: SPHN 18-03).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mohamad N, Mustafa M, Amal MNA, Saad MZ, Md Yasin IS, Al-Saari N. Environmental Factors Associated with

the Presence of Vibrionaceae in Tropical Cage-Cultured Marine Fishes. J Aquat Anim Health 2019; 31(2):154-67.

2. Nguyễn Thị Thanh Thủy, Nguyễn Hữu Dũng, I.Wergeland H. Thành phần protein và độc tính của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh lở loét trên cá mú chấm cam (*Epinephelus coioides*) nuôi thương phẩm tại Khánh Hòa. Tạp chí khoa học - Công nghệ thủy sản 2012; 4/2012:180-4.
3. Nguyễn Bá Hiên. Giáo trình miễn dịch học ứng dụng; NXB Đại học Nông nghiệp Hà Nội; 2010.
4. Nguyễn Trọng Nghĩa, Âu Thị Kim Ngọc, Nguyễn Thị Minh Trang, Đặng Thị Hoàng Oanh, Trương Quốc Phú, Phạm Anh Tuấn. Phân lập và xác định khả năng gây hoại tử gan tụy của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Hội nghị khoa học trẻ ngành thủy sản toàn quốc lần thứ IV 2013; Kỳ yếu:411-9.
5. Nishibuchi M, JB K. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* a virulence gene acqyred by a marine bacterium. Infection and immunity 1995; 63(6):2093-9.
6. Li L, Gao M, Lu T, Gu D. Dissection of ToxR-dependent and ToxR-independent stress-regulated pathways in *Vibrio parahaemolyticus*. Microbiological Research 2019; 223-225:79-87.
7. Zhou S, Gao ZX, Zhang M, Liu DY, Zhao XP, Liu Y. Development of a quadruplex loop-mediated isothermal amplification assay for field detection of four *Vibrio* species associated with fish disease. Springerplus 2016; 5:1104.
8. Klein SL, Gutierrez West CK, Mejia DM, Lovell CR. Genes similar to the *Vibrio parahaemolyticus* virulence-related genes *tdh*, *tlh*, and *vscC2* occur in other vibriionaceae species isolated from a pristine estuary. Appl Environ Microbiol 2014; 80:595-602.

9. Zulkifli Y, Alitheen NB, Son R, Yeap SK, Lesley MB, Raha AR. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by PCR targeted to the *toxR* gene and detection of virulence genes. International Food Research Journal 2009; 16:289-96.
10. Subhashini N, Krishnaiah N, C BK. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shell fish by cultural and polymerase chain reaction. International Journal of Pharma and Bio Sciences 2011; 2:335-41.
11. Yáñez R, Bastías R, G. H, Salgado O, Katharios P, Romero J, et al., Amplification of *tlh* gene in other Vibrionaceae specie by specie-specific multiplex PCR of *Vibrio parahaemolyticus*. Electronic Journal of Biotechnology 2015; 18:459-63.
12. Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MC, Jones DD, CA K. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh*. J Microbiol Methods 1999; 36(3):215-25.
13. Kim S, Chung HY, Lee DH, Lim JG, Kim SK, Ku HJ, et al., Complete genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain FORC_008, a foodborne pathogen from a flounder fish in South Korea. Pathog Dis 2016; 74(5):ftw044.
14. Trần Linh Phước. Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm; Nxb Giáo dục; 2009.
15. Institute. CaLS, Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests of bacteria isolate from aquatic animals, In: Third Edition M-A, editor., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, JR.: Approve Standard; (2006a).
16. Paranjpye RN, Myers MS, Yount EC, Thompson JL. Zebrafish as a model for *Vibrio parahaemolyticus* virulence. Microbiology 2013; 159:2605-15.
17. Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, M N. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene., J Clin Microbiol 1999; 37(4):1173-7.
18. Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. Reviews in Medical Microbiology 1993; 4:106-13.
19. Zulkifli Y, Alitheen NB, Son R, Raha AR, Yeap SK, M. N. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles in Padang, Indonesia. International Food Research Journal 2009; 16:53-8
20. Xu X, Cheng J, Wu Q, Zhang J, Xie T. Prevalence, characterization, and antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail aquatic products in North China. BMC Microbiol 2016; 16:32.
21. Shyne APS, Sobhanna KS, George KC, RR P. Phenotypic characteristics and antibiotic sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from diseases grouper (*Epinephelus* spp.). J Mar Biol Ass 2008; 50:1-6.
22. Li J, Yie J, Foo RWT, Ling JML, Xu HS, Woo NYS. Antibiotic resistance and plasmid profiles of vibrio isolates from cultured silver sea bream, *Sparus sarba*. Marine Pollution Bulletin 1999; 39:245-9.
23. Iida T, Suthienkul O, Park KS, Tang GQ, Yamamoto RK, Ishibashi M, et al., Evidence for genetic linkage between the *ure* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus*. J Med Microbiol 1997; 46:639-45.
24. Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. Infection and immunity 1995; 63:2093-9.
25. Xie ZY, Hu CQ, Chen C, Zhang LP, Ren CH. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. Lett Appl Microbiol 2005; 41:202-7.
26. Chakraborty RD, Surendran PK. Occurrence and distribution of virulent strains of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods marketed from Cochin (India). World Journal of Microbiology and Biotechnology 2008; 24:1929-35.
27. Nguyễn Văn Duy, Nguyễn Thị Cẩm Ly. Phân lập và xác định gen độc tố của *Vibrio parahaemolyticus* trong hải sản tươi sống ở Nha Trang. Tạp chí khoa học - Công nghệ thủy sản 2012; 2/2012:42-7.
28. Wong HC, Chen CH, Chung YJ, Liu SH, Wang TK, Lee CL, et al., Characterization of new O3:K6 strains and phylogenetically related strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Taiwan and other countries. J Appl Microbiol 2005; 98:572-80.
29. Wang D, Yu S, Chen W, Zhang D, Shi X. Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster tissues following artificial contamination and depuration. Lett Appl Microbiol 2010; 51:104-8.
30. Hoffmann M, Monday SR, Fischer M, Brown EW. Genetic and phylogenetic evidence for misidentification of *Vibrio* species within the Harveyi clade. Lett Appl Microbiol 2012; 54:160-5.
31. Pascual J, Macian MC, Arahal DR, Garay E, Pujalte MJ. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S *rRNA*, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. Int J Syst Evol Microbiol 2010; 60:154-65.
32. Vongxay K, Pan Z, Zhang X, Wang S, Cheng S, Mei L, et al., Occurrence of pandemic clones of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from seafood and clinical samples in a Chinese coastal province. Foodborne Pathog Dis 2008; 5(2):127-34.
33. Collin B, AS. R-H. Occurrence and potential pathogenesis of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* on the South Coast of Sweden. FEMS Microbiol Ecol 2011; 78(2):306-13.

Ngày nhận 13-8-2019

Ngày phản biện 23-8-2019

Ngày đăng 1-11-2019