

PHÁT HIỆN VÀ PHÂN LOẠI *BURKHOLDERIA* SPP. TỪ MẪU ĐẤT TẠI TỈNH NGHỆ AN

BÙI THỊ LAN ANH ⁽¹⁾, NGÔ THANH NAM ⁽¹⁾, DƯƠNG TUẤN LINH ⁽²⁾,
SHPAK IVAN MIKHAILOVIC ⁽³⁾, ZAKHAROVA IRINA BORISOVA ⁽³⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Burkholderia spp. có hơn 60 loài tồn tại trong môi trường đất, nước gây bệnh ở động vật và người, trong đó bao gồm phức hệ *Burkholderia pseudomallei*: *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* và một số loài mở rộng như *B. oklahomensis*, *B. humptydooensis*... Các loài trên tương đồng về kiểu hình, tính chất sinh hóa, tuy nhiên có các yếu tố độc lực khác nhau, dẫn đến khả năng gây bệnh khác nhau [13].

B. pseudomallei là tác nhân gây bệnh melioidosis, bệnh truyền nhiễm cấp tính trên người [11]. Bệnh melioidosis có diễn biến lâm sàng phức tạp, tỉ lệ tử vong cao, quá trình điều trị lâu dài với một số ít kháng sinh nhạy [1]. Bệnh melioidosis tập trung chủ yếu ở vùng Đông Nam Á và phía bắc nước Úc [16]. Gần đây phát hiện bệnh melioidosis và sự phân bố của *B. pseudomallei* ở Châu Mỹ, Madagascar, Mauritius, miền Nam, Bắc nước Mỹ, Đông và Tây Phi, Ấn Độ, Nam Á, Trung Quốc và Đài Loan [2]. *B. pseudomallei* có chung một tập hợp 2.590 gen với các thành viên khác của giống *Burkholderia*, có tính động học cao. 86% bộ gen *B. pseudomallei* K96243 dạng prototype phổ biến trong tất cả các chủng và tương ứng với vùng gen trung tâm (core genome), 14% có biến đổi trong tất cả các chủng phân lập [6]. Vùng gen biến đổi bao gồm nhiều đảo di truyền (genomic island) đóng vai trò liên quan đến độc lực và khả năng gây bệnh của vi khuẩn [17].

B. thailandensis được tìm thấy trong đất và nước ở Thái Lan và các nước Đông Nam Á khác. *B. thailandensis* có kiểu hình và kiểu gen tương tự *B. pseudomallei*, khó phân biệt với *B. pseudomallei* trên vùng gen rRNA 16S (rDNA), không có độc lực, ít khi gây bệnh trên người và động vật [3, 7].

B. mallei là nguyên nhân gây bệnh ở động vật như ngựa, bò (bệnh Glanders) phân bố ở Châu Phi, Châu Á, Trung Đông, Trung và Nam Mỹ [15]. Người nhiễm bệnh do sự tiếp xúc trực tiếp của vùng da, màng niêm mạc lở loét với mầm bệnh, hít phải nước bọt từ ngựa hoặc người mắc bệnh. Bệnh Glanders hình thành các tổn thương dạng nốt trong phổi và các vết loét màng niêm mạc của đường hô hấp trên [14]. Theo Trung tâm Kiểm soát và phòng ngừa bệnh tật Hoa Kỳ (CDC), cả hai loài *B. mallei* và *B. pseudomallei* đều có độc lực cao, có thể gây bệnh trên diện rộng khi bị phát tán. Về mặt di truyền, so với *B. mallei*, *B. pseudomallei* không chứa trình tự chèn IS407A trong gen *fliP*. Ngoài ra đoạn gen này chứa các trình tự khác biệt với các loài *Burkholderia* khác như *B. cepacia* [4].

B. cepacia thường gây bệnh do tiếp xúc trực tiếp giữa người với người; với dụng cụ nhiễm, môi trường chứa mầm bệnh. Bệnh cảnh lâm sàng rất đa dạng từ không có triệu chứng đến viêm phổi nặng suy hô hấp gây khó khăn trong chẩn đoán và điều trị [10].

Phân loại *Burkholderia* spp. dựa vào kiểu hình và kiểu gen và các tính chất sinh hóa. Trong nghiên cứu này, các mẫu đất thu thập ở các huyện Nghi Lộc, Diễn Châu (Nghệ An) được xử lý và nuôi cấy trên môi trường thạch chọn lọc Ashdown, tiến hành xác định các tính sinh hóa trên máy Vitek 2, multiplex PCR và realtime PCR. Phát hiện và phân loại *B. pseudomallei* và *B. mallei* được thực hiện trong cùng một phản ứng realtime PCR. Ngoài ra, nhóm tác giả thực hiện phản ứng multiplex PCR để phát hiện và phân loại *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* và *B. cepacia* [8].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu đất (102 mẫu) được thu thập tại huyện Nghi Lộc, huyện Diễn Châu tỉnh Nghệ An vào tháng 9 năm 2016.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập, xử lý và phân lập mẫu đất

Lấy 40÷50 g đất khu vực đồng ruộng, nằm sâu dưới mặt đất khoảng 30 cm. Mẫu thu thập đựng trong các túi nilong có nắp khóa, bảo quản ở nhiệt độ thường. Cân 10 g đất vào ống falcon 50ml, bổ sung 10ml dung dịch muối Threonine (TBSS-C50) vào từng ống mẫu. Đóng chặt nắp, ủ và lắc ở 40°C/40 giờ. Hút 100µl dung dịch nổi, cấy trên môi trường thạch chọn lọc Ashdown (tryptone 1g, agar 1,5g, glycerol 4ml, crystal violet (0,01%), 0,5ml neutral red (1%) 0,5ml, gentamicin nồng độ cuối 4mg/l. Ủ đĩa ở 42°C. Sau 24 giờ nuôi cấy, phát hiện 04 mẫu có các khuẩn lạc màu hồng. Sau 48 giờ các khuẩn lạc chuyển màu hồng tím, bề mặt khô. Tăng sinh chủng trong môi trường LB với glycerol 20% trong 18 giờ. Bảo quản tại -80°C.

2.2.2. Test sinh hóa trao đổi chất

Sử dụng hệ thống định danh Vitek 2 với thẻ định danh GN xác định 54 tính chất sinh hóa đặc trưng của các chủng *Burkholderia* spp..

2.2.3. Kỹ thuật sinh học phân tử

Với các chủng nghi ngờ *Burkholderia* spp., lựa chọn khuẩn lạc điển hình tách DNA. Các chủng được bất hoạt bằng dung dịch thimerosal với nồng độ 0.01% ở 65°C trong vòng 30 phút. Tách chiết DNA bằng bộ sinh phẩm DNA-Sorb (Amplisens - Nga). Tiến hành multiplex PCR với 03 cặp mồi bao gồm bm1F2: ACG TTC CTC GGC GCG ACG GAA AC, bm14R2: CCG GAT GAT GTT TCG AGT AGC CGT G độ dài khuếch đại 352bp; bps1F4: CGC ATT CGT TTT GCT GGG TTG CAT, bps8R4: TCT GCA GCG ACG AGC CGA TCC A, độ dài khuếch đại 440bp; bps1F3: ACG GCA ATT CCT CCA TTG CGA, bps1R3: CTC GTC AGG GTT GCG TCC GGA GT, độ dài khuếch đại 727bp để phát hiện và phân loại *B. cepacia*, *B. pseudomallei*, *B. mallei* và *B. thailandensis*, 2x PCR master mix solution (i-Taq) (INTRON- Hàn Quốc). Điều kiện nhiệt độ của phản ứng PCR là: 95°C/5 phút, (94°C /30 giây, 59,9°C/30 giây, 72°C/ 45 giây) 35 chu kỳ, 72°C/1 phút, 4°C bảo quản trên máy PCR. Các sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel điện di Agarose 1,5% (Thermal Scientific, Hoa Kỳ) trên máy điện di của hãng Consort - EV222 (Bỉ), nhuộm màu các phân tử DNA bằng chất nhuộm Ethidium Bromide (Thermal Scientific, Hoa Kỳ).

Tiến hành phát hiện vi khuẩn *B. pseudomallei* và *B. mallei* đồng thời bằng bộ sinh phẩm realtime PCR “Ampligen Burk-mallei/pseudomallei-PB- Nga”. Mẫu dò gắn chất phát huỳnh quang FAM/Green phát hiện *B. mallei* được thiết kế trên vùng gen *fliP*. Mẫu dò gắn huỳnh quang JOE/ Yellow phát hiện *B. pseudomallei* được thiết kế trên đoạn gen mã hóa protein gp68 và là một phần của vùng RimL. Sản phẩm ADN sau tách chiết, pha loãng 10.000 lần, sử dụng 10 µl DNA, tổng thể tích phản ứng 25 µl được tiến hành chạy realtime PCR. Điều kiện nhiệt độ: 95°C/15 phút, 5 chu kỳ (95°C/10 giây, 62°C/35 giây), (95°C/10 giây, 62°C/35 giây, FAM/green, JOE/yellow, Cy5/red) 40 chu kỳ. Thực hiện phản ứng trên máy Rotor-Gen Q.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Phân lập trên môi trường thạch chọn lọc

Từ 102 mẫu đất đã thu thập, sau khi xử lý và nuôi cấy trên đĩa thạch chọn lọc Ashdown phát hiện được 04 mẫu đất có khuẩn lạc (mẫu 2.1; 3.2; 3.3; 3.4) nghi ngờ *Burkholderia* spp. Màu sắc, hình thái khuẩn lạc mọc trong 24 giờ đầu có màu hồng, trong 48 đến 96 giờ chuyển sang màu hồng tím. Nuôi cấy trên môi trường chọn lọc, dựa vào hình thái đặc trưng là một trong các tiêu chuẩn để phát hiện *B. pseudomallei*. Tuy nhiên, do *Burkholderia* spp. đa dạng về loài, đặc điểm về hình thái khá tương đồng, cần tiến hành xác định tính chất sinh hóa.

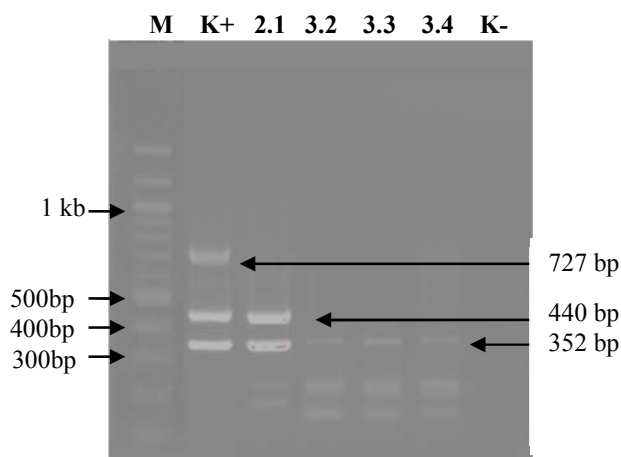
3.2. Định danh chủng vi khuẩn *Burkholderia* spp. trên hệ thống Vitek 2

Các khuẩn lạc điển hình phân lập từ các mẫu 2.1; 3.2; 3.3; 3.4 được tiến hành xác định đặc điểm sinh hóa bằng máy Vitek 2. Kết quả cho thấy 04 mẫu trên thuộc nhóm *B. cepacia* với các đặc điểm như: D-cellobiasis (dCEL+), không có L-prolinaramidase (ProA-), tyrosinarilamidase (TyrA-) và β-N acetylgalactosaminidase (NAGA-). Tuy nhiên có sự khác biệt về phổ sinh hóa giữa mẫu 2.1 với 03 mẫu còn lại, vì vậy cần tiến hành các phản ứng sinh học phân tử (multiplex PCR, realtime PCR) bởi việc xác định loài bằng máy Vitek 2 thường có một số sai sót khi phân biệt giữa *B. pseudomallei* và *B. cepacia*, số trường hợp phát hiện đúng *B. pseudomallei* chỉ chiếm từ 63% đến 81%, tương tự sai sót khi phân biệt giữa *B. thailandensis* và *B. cepacia* với *B. pseudomallei* [5, 9, 12].

3.3. Định danh bằng phản ứng multiplex PCR và realtime PCR

Trong phản ứng multiplex PCR, hai cặp mồi (Bm1F2, Bm1R2 và Bps1F3, Bps1R3) tương ứng với độ dài đoạn gen khuếch đại là 352 bp và 727 bp được thiết kế trên vùng gen B metallo-beta-lactamase để phân biệt phức hệ *B. pseudomallei* và *Burkholderia cepacia*. Để phân loại *B. pseudomallei*, *B. mallei* và *B. thailandensis* sử dụng cặp mồi Bps1F4, Bps1R4 được thiết kế trên vùng gen D beta-lactamase với độ dài 440 bp. Như vậy nếu xuất hiện 3 băng (352 bp, 440 bp và 727 bp) khẳng định *B. pseudomallei*, xuất hiện hai băng (352bp và 440bp) khẳng định *B. thailandensis*, xuất hiện một hoặc hai băng (727bp hoặc 352bp; 727bp) khẳng định *B. mallei*, nếu chỉ xuất hiện một băng (352bp) là *B. cepacia* [8].

Kết quả điện di sản phẩm phản ứng multiplex PCR của các mẫu nghiên cứu được thể hiện ở hình 1. Kết quả định danh loài được trình bày ở bảng 1. Mẫu chứng dương là *B. pseudomallei* cho kết quả xuất hiện 03 băng điện di. Mẫu 2.1 xuất hiện 02 băng điện di khẳng định là *B. thailandensis*. Các mẫu 3.2; 3.3 và 3.4 tương ứng nhóm *B. cepacia* khi chỉ xuất hiện 01 băng điện di.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng multiplex PCR

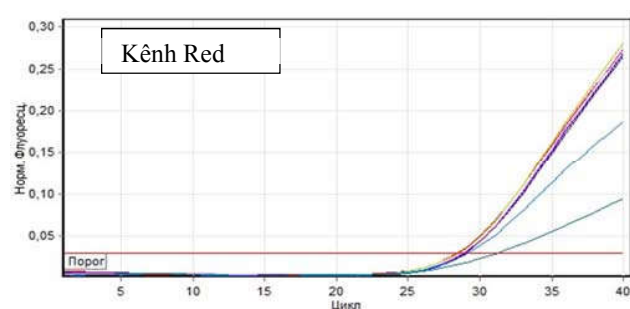
M: Thang chuẩn DNA (100 bp); K-: chứng âm; K+: chứng dương,
các mẫu 2.1; 3.2;3.3;3.4

Bảng 1. Kết quả phản ứng multiplex PCR

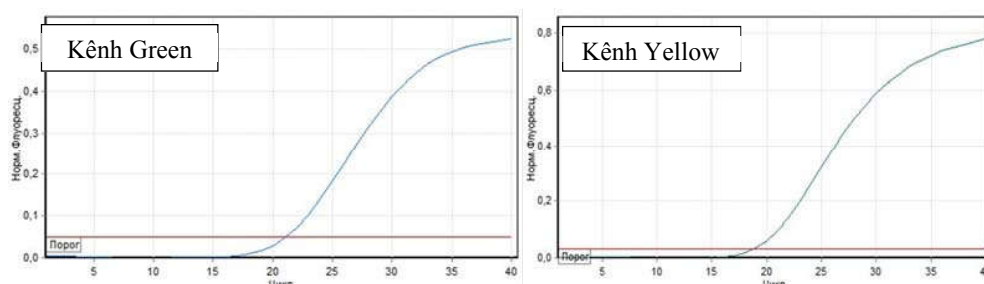
Mẫu nghiên cứu	Độ dài đoạn gen khuếch đại (bp)			Định danh loài
	727	440	352	
Chứng âm	-	-	-	
Chứng dương	+	+	+	<i>B. pseudomallei</i>
2.1	-	+	+	<i>B. thailandensis</i>
3.2	-	-	+	<i>B. cepacia</i>
3.3	-	-	+	<i>B. cepacia</i>
3.4	-	-	+	<i>B. cepacia</i>

3.4. Phát hiện *Burkholderia* spp. bằng realtime PCR

Tiến hành phản ứng realtime PCR với các mẫu: 01 chứng dương *B. pseudomallei*, 01 chứng dương *B. mallei*, 01 chứng âm *B. pseudomallei*, 01 chứng âm *B. mallei* và 04 mẫu. Kiểm tra nội chứng trên kênh Red, nhận thấy các mẫu đều có tín hiệu huỳnh quang với giá trị Ct < 31.



Hình 2. Kênh Red của realtime PCR



Hình 3. Kênh Green của realtime PCR phát hiện *B. mallei*, kênh Yellow của realtime PCR phát hiện *B. pseudomallei*

Kênh Green phát hiện *B. mallei*, chỉ xuất hiện tín hiệu huỳnh quang của chứng dương *B. mallei* với giá trị Ct là 21.16; khẳng định không có mẫu nào dương tính với *B. mallei*.

Kênh Yellow phát hiện *B. pseudomallei*, chỉ xuất hiện tín hiệu huỳnh quang của chứng dương *B. pseudomallei* với giá trị Ct là 18.87; khẳng định không có mẫu nào dương tính với *B. pseudomallei*.

Như vậy trong 04 mẫu (2.1; 3.2; 3.3; 3.4) không có mẫu nào dương tính với *B. pseudomallei* và *B. mallei*. Kết quả này tương đồng với xét nghiệm trên máy Vitek 2, phản ứng multiplex PCR.

4. KẾT LUẬN

Phân lập được 04/102 mẫu dương tính với *Burkholderia* spp. trên môi trường thạch chọn lọc tại huyện Diễn Châu và huyện Nghi Lộc, tỉnh Nghệ An năm 2016.

Kết hợp các xét nghiệm sinh hóa, realtime PCR, multiplex PCR xác định chủng 2.1 là *B. thailandensis* và các chủng 3.2; 3.3; 3.4 là *B. cepacia*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dương Tuấn Linh, *Tổng quan về Burkholderia pseudomallei và bệnh melioidosis*, Tạp chí Y học dự phòng, 2017, **27**:9-20.
2. Cheng A.C., Currie B.J., *Melioidosis: epidemiology, pathophysiology and management*, Clin Microbiol Rev, 2005, **18**(2):383-416.

3. Chinn-Woan Lowe, Benjamin A. Satterfield, *A quadruplex realtime PCR Assay for the rapid detection and differentiation of the most relevant members of the B. pseudomallei complex: B. mallei, B. pseudomallei and B. thailandensis*, Plos one, 2016, **11**(10), doi: 10.1371/journal.pone.0164006.
4. Damian H. Gilling, *The identification and differentiation between Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei, Using one gene pyrosequencing*. Hindawi publishing Corporation, 2014, doi:10.1155/2014/109583.
5. Deepak R. N., Crawley B., Phang E., *Burkholderia pseudomallei identification: a comparison between the API 20NE and VITEK 2 GN systems*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008, **102**:S42-S44.
6. Gee J.E., Glass M.B., Novak R.T., Gal D., Mayo M.J., *Recovery of a Burkholderia thailandensis-like isolate from an Australian water source*, BMC microbiology, 2008, **8**(54), doi: 10.1186/1471-2180-8-54.
7. Glass M.B., Gee J.E., Steigerwalt A.G., *Pneumonia and Septicemia Caused by Burkholderia thailandensis in the United States*, J Clin Microbiol, 2006, **44**(12):4601-4604.
8. Irina Zakharova, Natalya Teteryatnikova, Andrey Toporkov, Dmitry Viktorov, *Development of a multiplex PCR assay for the detection and differentiation of Burkholderia pseudomallei, Burkholderia mallei, Burkholderia thailandensis, and Burkholderia cepacia complex*, Acta Tropica, 2017, **174**:1-8.
9. Kiratisin P., Santanirand P., S. *Accuracy of commercial systems for identification of Burkholderia pseudomallei versus Burkholderia cepacia*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007, **59**:277-281.
10. Leang-Chung Choh, Guang-Han Ong, *Burkholderia vaccines: are we moving forward?* Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2013, **3**, doi:10.3389/fcimb.2013.00005.
11. Limmathurotsakul D., Wuthiekanun V., Amornchai P., Wongsuwan G., Day N.P., Peacock S.J., *Effectiveness of a Simplified Method for Isolation of Burkholderia pseudomallei from Soil*, Applied and environmental microbiology, 2012, **78**:876-877.
12. Lowe P., Haswell H., Lewis K., *Use of various common isolation media to evaluate the new VITEK 2 colorimetric GN Card for identification of Burkholderia pseudomallei*, J Clin Microbiol, 2006, **44**:854-856.
13. Thibault F.M., Valade E., Vidal D.R., *Identification and discrimination of Burkholderia pseudomallei, B. mallei and B. thailandensis by realtime-PCR, targeting type III secretion system genes*, Journal of clinical microbiology, 2004, **42**(12):5871-5874.

14. Van Zandt, Kristopher E., Greer, Marek T., *Glanders: an overview of infection in humans*. BioMedCentral.com, 2013, doi:10.1186/1750-1172-8-131.
15. Whilock G.C., Este D.M., Torrse A.G., *Glanders: off to races with Burkholderia mallei*. FEMS Microbiol Lett, 2007, **277**(2):115-122.
16. Whitmore A., Krishnaswami C.S., *An account of the discovery of a hitherto under scribed infective disease occurring among the population of Range*, Ind Med Gaz, 1912, **47**:262-267.
17. Wiersinga, W.J., B.J. Currie, S.J. Peacock, *Melioidosis*, New England Journal of Medicine, 2012, **367**(11):1035-1044.

SUMMARY

IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF BURKHOLDERIA SPP. FROM ENVIRONMENTAL SOIL IN NGHE AN PROVINCE

More than 60 species belong to *Burkholderia* genus were found in water and soil environment, some of them could cause diseases for both human and animals. The *B. pseudomallei* complex classically consisted of *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* and some extended species such as *B. oklahomensis*, *B. humptydooensis*... based on similarity in phenotypes and biochemical characteristics. In this study, both realtime PCR and multiplex PCR techniques were applied to identify and classify *Burkholderia* spp. from environmental soil samples collected in Nghe An province. Realtime PCR method was used to classify *B. mallei*, *B. pseudomallei* while multiplex PCR method was applied to differentiate *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. cepacia*. Four *Burkholderia* spp. strains were isolated in which 1 strain was *B. thailandensis* and 3 others were *B. cepacia*.

Từ khóa: *Burkholderia* spp., *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*.

Nhận bài ngày 20 tháng 6 năm 2017

Hoàn thiện ngày 24 tháng 10 năm 2017

⁽¹⁾ Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

⁽²⁾ Viện Y học Dự phòng Quân đội, Cục Quân y

⁽³⁾ Viện Nghiên cứu phòng chống dịch hạch Volgograd, Liên bang Nga