

**XÁC ĐỊNH CÁC GEN SINH ĐỘC TỔ CỦA VI KHUẨN E. COLI PHÂN LẬP
TỪ LỢN CON BỊ TIÊU CHẢY**

Nguyễn Xuân Hòa, Lê Văn Phước,
Phạm Quang Trung, Lê Xuân Ánh, Hồ Lê Quỳnh Châu
Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

TÓM TẮT

Nghiên cứu về gen sản sinh độc tố *STa*, *STb*, *LT*, *VT2e* của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được trên địa bàn Thừa Thiên Huế cho kết quả như sau: Với mẫu bệnh phẩm là tim tỷ lệ dương tính với một trong các yếu tố độc lực là 4/6 (66,67%), bệnh phẩm ruột 3/6 (50%) và bệnh phẩm phân 20/49 (40,82%). Tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen *LT* cao nhất 25/61 (40,98%), kế tiếp là vi khuẩn *E. coli* mang gen *STb* 18/61 (29,51%) và vi khuẩn *E. coli* mang gen *STa* 9/61 (14,75%) sau cùng là vi khuẩn *E. coli* mang gen sản sinh độc tố dung huyết *VT2e* 6/61 (9,84%). Gen *STa/STb* số lượng 2/25 (chiếm tỷ lệ 8%), *STa/LT* 4/25 (chiếm tỷ lệ 16%), *STa/VT2e* số lượng 3/25 (chiếm tỷ lệ 12%). Trong tổ hợp 2 gen cao nhất là *STb/LT* 9/25 (chiếm tỷ lệ 36%). Tổ hợp 3 gen gồm có: *STa/STb/VT2e* 1/25 (chiếm tỷ lệ 4%), *STa/LT/VT2e* 1/25 (chiếm tỷ lệ 4%), cao nhất là *STb/LT/VT2e* 2/25 (chiếm tỷ lệ 8%). Tần suất hiện khuẩn lạc mang gen *STb* (0,43), *LT* (0,36).

Từ khóa: Gen sản sinh độc tố, độc tố đường ruột, độc tố VT2.

1. Đặt vấn đề

Tiêu chảy ở lợn con do nhiều nguyên nhân gây ra như vi khuẩn, virus, ký sinh trùng, độc tố, thức ăn, thời tiết, vệ sinh chăm sóc nuôi dưỡng..., xét về nguyên nhân vi khuẩn học, các serotype *E. coli* có khả năng sản sinh độc tố đường ruột (Enterotoxigenic *E. coli*- ETEC), đã được nhiều tác giả trên thế giới thống nhất là một trong số các nguyên nhân thường gặp và quan trọng gây bệnh tiêu chảy lợn con (Fairbrother, 1992). Các chủng vi khuẩn *E. coli* thuộc nhóm ETEC tham gia vào quá trình gây bệnh nhờ hai yếu tố độc lực chủ yếu: khả năng bám dính vào các tế bào niêm mạc ruột nhờ các kháng nguyên bám dính (pili) có trên bề mặt của vi khuẩn như F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F17, F18, F41 và khả năng sản sinh một hay nhiều loại độc tố đường ruột (Enterotoxin) bao gồm độc tố chịu nhiệt ST (heat stable toxin) và độc tố không chịu nhiệt LT (heat labile toxin) Nagy (1999) & Ngeleka (2003). Xác định một chủng vi khuẩn *E. coli* có độc lực và có vai trò trong quá trình gây bệnh thì phải xác định chúng mang một hoặc hai yếu tố gây bệnh nói trên.

2. Nguyên liệu, nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

- Các mẫu bệnh phẩm: phân, tim, ruột của lợn con sau cai sữa bị bệnh tiêu chảy được nuôi cấy trên môi trường EMB để phân lập vi khuẩn E. coli (Quinn, 1994).

Thành phần môi trường nước thịt (Nutrient broth)

Peptone from meat 5 g

Meat extract 3 g

- Cách pha chế: hòa tan 8 g vào 1000 ml nước cất, điều chỉnh pH=7. Hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút.

- Nguyên liệu dùng cho phản ứng PCR (Primer, IQ supermix, Enzyme load, do công ty Biorad cung cấp.

- DNA của các giống E. coli chuẩn: 281: LT+, 256: STa+, STb+, 391: VT2e do Phân viện Thú y miền Trung cung cấp.

Chuẩn bị môi (primer)

Các cặp môi (môi xuôi và môi ngược) được dùng để xác định một số yếu tố độc lực của E. coli có trình tự nucleotid theo thiết kế của Vũ Khắc Hùng 2005, do công ty BioRad cung cấp.

Môi	Trình tự môi	Gen	Kích cỡ (bp)
STa-1	5'-TCC GTG AAA CAA CAT GAC GG-3'	estA	244
STa-2	3'-ATA ACA TCC AGC ACA GGC GGC AG-5'		
STb-1	5'-GCC TAT GCA TCT ACA CAA TC-3'	estB	278
STb-2	3'-TGA GAA ATG GAC AAT GTC CG-5'		
LT-1	5'-ATT TAC GGC GTT ACT ATC CTC-3'	elt	281
LT-2	3'-TTT TGG TCT CGG TCA GAT ATG-5'		
VT2e-1	5'-CCT TAA CTA AA GGA ATA TA-3'	evt	267
VT2e-2	3'-CTG GTG GTG TAT TAA TA-5'		

Thành phần phản ứng PCR đơn với các cặp môi STa, STb, LT, VT2e

TT	Thành phần	Thể tích (µl)
1	PCR Master Mix	5
2	Primer xuôi	0,25

3	Primer ngược	0,25
4	Nước cất	3,5
5	DNA khuôn	1
Tổng		10

2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

- Dùng tăm bông ngoáy sâu vào trực tràng, cho vào túi bóng sạch có chứa nước muối sinh lý NaCl 0, 85%. Lợn con sau cai sữa bị bệnh tiêu chảy sắp chết tiến hành mổ và lấy bệnh phẩm là tim, gan, ruột cho vào túi bóng sạch. Mẫu được bảo quản ở 0°C, sau đó vận chuyển về phòng thí nghiệm.

- Xác định hình thái và đặc tính nuôi cấy của vi khuẩn E. Coli theo phương pháp của (Quinn,1994).

- Phương pháp tách chiết DNA của vi khuẩn E. coli theo Phạm H. S (1999).

Vi khuẩn E. coli từ môi trường bảo quản, cấy vào môi trường nước thịt, peptone, sau 18 – 24 giờ nuôi cấy ở 37°C.

Bước 1: hút 100 µl dung dịch mẫu (canh khuẩn) cho vào ống Eppendorf tương ứng. Ly tâm ở 4°C trong thời gian 3 phút với tốc độ 3000 vòng phút. Hút bỏ dịch nổi (giữ lại cặn chứa vi khuẩn).

Bước 2: Tiếp tục ly tâm gạn rửa 2 lần bằng dung dịch sinh lý NaCl 0,85%.

Bước 3: Tái huyền phù bằng nước cất 2 lần 200 µl, cho vào ống Eppendorf đun cách thủy 95°C/3-5 phút.

Bước 4: Ly tâm 4°C, tốc độ 4.000 vòng/ phút. Hút 150 µl nước mặt có chứa DNA làm khuôn cho phản ứng PCR bảo quản ở 4°C.

- Xác định gen sản sinh độc tố STa, STb, LT, VT2e bằng PCR như mô tả của Blanco & Cs, 1995.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả kiểm tra tỷ lệ dương tính với một trong các gen độc từ các nhóm bệnh phẩm khác nhau

Bảng 1. Kết quả kiểm tra vi khuẩn E. coli mang gen sinh độc tố

TT	Bệnh phẩm	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ %
1	Mẫu tim	6	4	66,67
2	Mẫu ruột	6	3	50
3	Mẫu phân	49	20	40,82

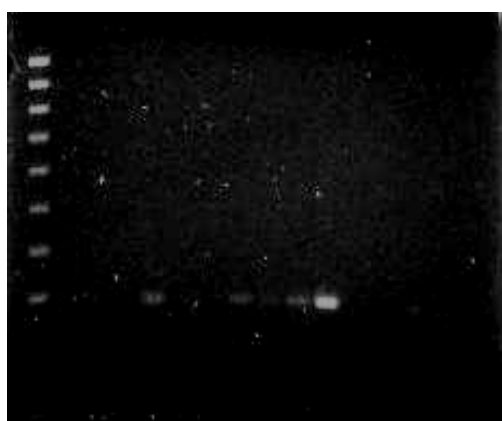
Qua bảng 1, từ 3 loại bệnh phẩm khác nhau là tim, ruột và phân chúng tôi thu được kết quả: đối với mẫu bệnh phẩm là tim, tỷ lệ dương tính với một trong các yếu tố độc lực là 4/6 (66,67%), bệnh phẩm ruột 3/6 (50%) và bệnh phẩm phân 20/49 (40,82%). Có sự chênh lệch về số lượng mẫu bệnh phẩm là do mẫu bệnh phẩm là tim và ruột, chúng tôi thu thập được khi con vật bị bệnh tiêu chảy nặng sắp chết, chúng tôi tiến hành mổ khám, thu mẫu tim, ruột của lợn bệnh mang về phòng thí nghiệm tiến hành phân tích, còn bệnh phẩm là phân thì chúng tôi thu thập từ các lợn sau cai sữa bị bệnh tiêu chảy số lượng lớn, thu thập dễ hơn và thuận lợi trong quá trình thu thập nên số lượng mẫu lớn.

3.2. Tần suất phân bố của *E. coli* mang gen sinh độc tố

Bảng 2. Tần suất vi khuẩn *E. coli* mang gen qui định sinh độc tố

TT	Gen kiểm tra	Số chủng kiểm tra	Số chủng dương tính	Tỷ lệ %
1	STa	61	9	14,75
2	STb	61	17	27,87
3	LT	61	25	40,98
4	VT2e	61	6	9,84

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



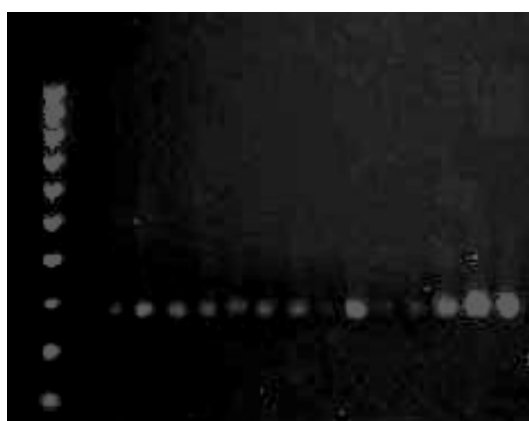
Ảnh 1. Các sản phẩm của phản ứng PCR với các gen *STa*, *STb*, *LT* sau quá trình điện di trên thạch. M: 100 bp DNA marker.

Giếng 4 chủng *P*₃₂ (*STb* +)

Giếng 7 đối chứng dương *LT*

Giếng 8 *P*₂₅ (*LT*+), 9 *P*₂₆ (*LT* +), 10 *P*₂₇ (*LT* +)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Ảnh 2. Các sản phẩm của phản ứng PCR với các gen *STb*, *LT* sau quá trình điện di trên thạch. M: 100 bp DNA marker.

Giếng 4 đối chứng dương *STb* +

Giếng 2 (*P*₄₈) giếng 3 (*P*₄₉) dương tính với *STb*+

Giếng 5 đối chứng dương *LT*+

Giếng 7 (*P*₄₂), 8 (*P*₄₃), 9 (*P*₄₄), 11(*P*₄₅), 13 (*P*₄₇), 14(*P*₄₈), 15(*P*₄₉) dương tính *LT*

Qua bảng 2 chúng tôi nhận thấy: từ 61 mẫu bệnh phẩm chúng tôi đã phân lập được 61 chủng vi khuẩn E. coli qua phân tích gen bằng kỹ thuật PCR với các nhóm gen STa, STb, LT, VT2e thu được kết quả như sau: tỷ lệ vi khuẩn E. coli mang gen LT cao nhất 25/61 (40,98%), kế tiếp là vi khuẩn E. coli mang gen STb 17/61 (27,87%) và vi khuẩn E. coli mang gen STa 9/61 (14,75%) sau cùng là vi khuẩn E. coli mang gen sản sinh độc tố dung huyết VT2e 6/61(9,84). Có sự sai khác đó theo chúng tôi do nhóm gen VT2e qui định khả năng sản sinh độc tố dung huyết, đối tượng này thường thấy ở lợn con phù đầu hoặc mang chủng vi khuẩn gây bệnh phù đầu (Vũ Khắc Hùng, 2005).

3.3. Tổ hợp gen của các yếu tố sinh độc tố

Vi khuẩn E. coli muốn gây được bệnh cho gia súc phải mang gen mã hóa hai yếu tố bám dính và sản sinh độc tố, việc xác định vi khuẩn mang một hay nhiều nhóm độc tố có ý nghĩa lớn trong nghiên cứu vi khuẩn học. Qua phân tích gen chúng tôi nhận thấy, từ 61 chủng E. coli có 25 chủng có chứa một đến bốn trong số các gen (STa, STb, LT, VT2e). Chúng tôi chỉ trình bày các chủng vi khuẩn E. coli mang lớn hơn hoặc hai trong số 4 gen trên.

Qua bảng 3 chúng ta thấy các chủng vi khuẩn E. Coli, chúng tôi nghiên cứu thuộc các tổ hợp gen mã hóa 2 hoặc 3 nhóm độc tố thuộc các tổ hợp gen sau: Tổ hợp 2 gen gồm có: Gen STa/STb số lượng 1/19 (tỷ lệ 5,3%), STa/VT2e số lượng 2/19 (tỷ lệ 10,5%). Trong tổ hợp 2 gen cao nhất là STb/LT 11/19 (tỷ lệ 57,89%). Tổ hợp 3 gen gồm có: STa/STb/VT2e 1/19(chiếm tỷ lệ 5,3%), STa/LT/VT2e 1/19 (chiếm tỷ lệ 5,3%), STb/LT/VT2e 2/19(chiếm tỷ lệ 10,5%), STa/STb/VT2e/LT 1/19 (chiếm tỷ lệ 5,3%)

Bảng 3. Tổ hợp gen của các gen sản sinh độc tố

TT	Gen kiểm tra	Chủng mang gen qui định yếu tố độc lực	
		Số lượng	Tỷ lệ %
1	STa/STb	1/61	1/19
2	STa/LT	0/61	0/19
3	STa/VT2e	2/61	2/19
4	STb/VT2e	0/61	0/19
5	STb/LT	11/61	11/19
6	STa/STb/LT	0/61	0/19
7	STa/STb/VT2e	1/61	1/19
8	STa/LT/VT2e	1/61	1/19
9	STb/LT/VT2e	2/61	2/19
10	STa/STb/VT2e/LT	1/61	1/19
Tổng		19/61	1

4. Kết luận và đề nghị

4.1. Kết luận

- Với mẫu bệnh phẩm là tìm tỷ lệ dương tính với một trong các yếu tố độc lực là 4/6 (66,67%), bệnh phẩm ruột 3/6 (50%) và bệnh phẩm phân 20/49 (40,82%).

- Tỷ lệ vi khuẩn E. coli mang gen LT cao nhất 25/61 (40,98%), kế tiếp là vi khuẩn E. coli mang gen STb 17/61 (27,87%) và vi khuẩn E. coli mang gen STa 9/61 (14,75%) sau cùng là vi khuẩn E. coli mang gen sản sinh độc tố dung huyết VT2e 6/61(9,84).

- Tổ hợp 2 gen gồm có: Gen STa/STb số lượng 1/19 (tỷ lệ 5,3%), STa/VT2e số lượng 2/19 (tỷ lệ 10,5%). Trong tổ hợp 2 gen cao nhất là STb/LT 11/19 (tỷ lệ 57,89%). Tổ hợp 3 gen gồm có: STa/STb/VT2e 1/19 (chiếm tỷ lệ 5,3%), STa/LT/VT2e 1/19 (chiếm tỷ lệ 5,3%), cao nhất là STb/LT/VT2e 2/19 (chiếm tỷ lệ 10,5%), STa/STb/VT2e/LT 1/19 (chiếm tỷ lệ 5,3%).

4.2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu kháng nguyên bám dính và nghiên cứu sâu hơn về các gen sản sinh độc tố.

Thí nghiệm gây bệnh thực nghiệm trên động vật thí nghiệm để kiểm nghiệm độc tính của các nhóm gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Blanco, M., Blanco J.E., Gozalez E.A., Mora A., Jansen W., Gomes T.A., Zerbini L.F., Yano T., Pestana de Castro A.F., *Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine E. coli strains belonged to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes*, J. Clin. Microbiol, 35, (1997), 2958 - 2963.
2. Vũ Khắc Hùng, *Xác định các loại độc tố thường gặp của vi khuẩn E. coli phân lập từ lợn con bị bệnh tiêu chảy bằng phương pháp PCR*, Khoa học kỹ thuật Thú y, tập XII số 2, (2005), 54 - 61.
3. Pham HS, Kiuchi A & Tabuchi K., *Methods for rapid cloning and detection for sequencing of cloned inverse PCR-generated DNA fragments adjacent to known sequences in bacterial chromosomes*, Microbiol Immunol, 43 (9), (1999), 829-36.
4. Quinn P. J., Markey B. & Carter G. R., *Clinical veterinary microbiology*, Wolfe, 1994.

IDENTIFICATION OF COMMON TOXINS OF E. COLI ISOLATED FROM DIARRHOEIC WEANED PIGLET

*Nguyen Xuan Hoa, Le Van Phuoc,
Pham Quang Trung, Le Xuan Anh, Ho Le Quynh Chau
College of Agriculture and Forestry, Hue University*

SUMMARY

The identification of common toxin of E. coli in 61 strains isolated from diarrhoeic post weaned piglets was conducted by PCR. The results from 61 strains isolated showed that there were 25 isolates having the LT toxin representing 40,98%, the rate of isolates having toxin STb was 27,87% and that of isolates having STa and VT2e were 29,51, 14,75 and 9,84 %.