

ISSN 0866-7020

*Tap chí*

**NÔNG NGHIỆP  
&  
PHÁT TRIỂN  
NÔNG THÔN**

*Science and Technology Journal  
of Agriculture & Rural Development*

MINISTRY OF AGRICULTURE AND RURAL DEVELOPMENT, VIETNAM

*Tap chí Khoa học và Công nghệ*  
BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

14

2010



(xuôi và ngược) được dùng để xác định một số yếu tố độc lực của *E. coli* do Vũ Khắc Hùng (2005) thiết kế.

2. Phương pháp nghiên cứu

Dùng tam 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 sấp chết được tiến hành mổ và lấy bệnh phẩm là tim, gan, ruột cho vào túi bóng sạch. Mẫu được bảo quản ở 0°C. Xác định hình thái và đặc tính nuôi cấy của vi khuẩn *E. coli* theo phương pháp của Quinn, 1994. Tách chiết ADN của vi khuẩn *E. coli* theo Phạm H. S. (1999), vi khuẩn *E. coli* từ môi trường bảo quản được nuôi cấy trong môi trường nước thịt + peptone từ 18-24 giờ ở 37°C. Sau đó hút 100 µl canh khuẩn cho vào ống Eppendorf và ly tâm ở 4°C trong 3 phút với tốc độ 3000 vòng/phút. Thu kết tủa và ly tâm gạn rửa 2 lần bằng NaCl 0,85%. Tái huyền phù bằng 200 µl nước cất 2 lần và đun cách thủy ở 95°C/3-5 phút. Ly tâm 4°C, tốc độ 4000 vòng/phút, trong 4 phút. Hút 150 µl thể nổi có chứa ADN bảo quản ở 4°C để làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR sau này. Xác định gen sản sinh độc tố STa, STb, LT, VT2e bằng PCR theo Blanco và cs (1995).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kiểm tra tỷ lệ dương tính với một trong các gen độc tố của 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	Tim	6	4	66,67
2	Ruột	6	3	50,00
3	Phân	49	20	40,82

Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy đối với mẫu bệnh phẩm là tim tỷ lệ dương tính với một trong các yếu tố độc lực là 4/6 (66,67%), ruột là 3/6 (50%) và phân 20/49 (40,82%). Sở dĩ có sự chênh lệch về số lượng mẫu bệnh phẩm là do mẫu bệnh phẩm tim và ruột được thu thập khi con vật bị bệnh tiêu chảy nặng sấp chết. Còn bệnh phẩm là phân thì chỉ được thu thập từ các lợn sau cai sữa bị bệnh tiêu chảy số lượng lớn, thu thập dễ và thuận lợi hơn nên có số lượng mẫu lớn hơn.

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

Từ 61 mẫu bệnh phẩm đã phân lập được 61 chủng vi khuẩn *E. coli*, và kết quả phân tích

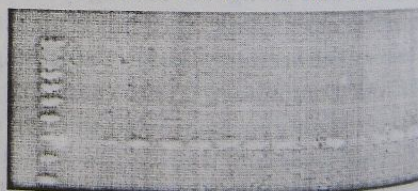
PCR với các nhóm gen STa, STb, LT, VT2e như sau: tỷ lệ *E. coli* mang gen LT cao nhất là 25/61 (40,98%), kế tiếp là gen STb 17/61 (27,87%), gen STa 9/61 (14,75%), và sau cùng là gen VT2e 6/61 (9,84%) (Bảng 2, hình 1 và 2).

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



Hình 1: Điện di các sản phẩm PCR đặc hiệu của các gen STa, STb, LT trên agarose gel. M: 100 bp DNA marker. 4: chủng P<sub>32</sub> (STb+), 7: đối chứng dương LT, 8: chủng P<sub>25</sub> (LT+), 9: chủng P<sub>26</sub> (LT+), 10: chủng P<sub>27</sub> (LT+). Các giếng còn lại âm tính với gen kiểm tra.



Hình 2: Điện di các sản phẩm PCR đặc hiệu của các gen STb, LT trên agarose gel. M: 100 bp DNA marker. 4: đối chứng dương STb+, 5: đối chứng dương STb+, 7: chủng (P<sub>42</sub>), 8: chủng (P<sub>43</sub>), 9: chủng (P<sub>44</sub>), 13: chủng (P<sub>45</sub>), 14: chủng (P<sub>46</sub>) dương tính LT. Các giếng còn lại âm tính với gen kiểm tra.

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

Vi khuẩn *E. coli* 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 quan trọng trong nghiên cứu vi khuẩn học. Qua phân tích gen nhận thấy từ 61 chủng *E. coli* có 25 chủng chứa 1-4 các gen STa, STb, LT, VT2e. Dưới đây chỉ trình bày các chủng vi khuẩn

*coli* ma  
bảng 3  
thuộc c  
độc tố  
chiếm t  
và cao  
Tổ  
chiếm  
(5,3%),  
gen S  
Bản

TT
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

một t  
ruột  
Tỷ lệ  
25/6  
(27,8  
VT2e



# XÁC ĐỊNH CÁC GIEN SINH ĐỘC TỔ CỦA VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* PHÂN LẬP TỪ LỢN CON BỊ TIÊU CHẢY

Nguyễn Xuân Hòa<sup>1</sup>, Lê Văn Phước<sup>1</sup>, Phạm Quang Trung<sup>1</sup>, Hồ Lê Quỳnh Châu<sup>1</sup>, Lê Xuân Ánh<sup>1</sup>

## 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 tìm tỷ lệ dương tính với một trong các yếu tố độc lực là 4/6 (66,67%), ruột là 3/6 (50%) và phân là 20/49 (40,82%). Tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen LT cao nhất là 25/61 (40,98%), kế tiếp là gen STb 17/61 (27,87%), gen STa 9/61 (14,75%), và sau cùng là gen VT2e 6/61 (9,84%). Tổ hợp 2 gen gồm có: gen STa/STb chiếm tỷ lệ 1/19 (chiếm 5,3%), STa/VT2e là 2/19 (10,5%), và cao nhất là STb/LT 11/19 (57,89%). Tổ hợp 3 gen gồm có: STa/STb/VT2e 1/19 (5,3%), STa/LT/VT2e 1/19 (5,3%), cao nhất là STb/LT/VT2e 2/19 (10,5%), và tổ hợp 4 gen STa/STb/VT2e/LT 1/19 (5,3%).  
 Từ khóa: Gen sản sinh độc tố, độc tố đường ruột, độc tố VT2.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tiêu chảy ở lợn con do nhiều nguyên nhân gây ra như: vi khuẩn, virút, ký sinh trùng, độc tố, thực an, thời tiết, vệ sinh chăm sóc nuôi dưỡng...; xét về nguyên nhân vi khuẩn học, các kiểu huyết thanh của *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 thương gặp và quan trọng gây hội chứng 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. Bài viết này giới thiệu kết quả nghiên cứu: "Xác định các gen sinh độc tố của vi khuẩn *Escherichia coli* phân lập từ lợn con bị tiêu chảy".

## II. NGUYÊN LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Nguyên liệu

- Các mẫu bệnh phẩm: phân, tim, ruột của lợn con sau cai sữa bị bệnh tiêu chảy ở một số nông hộ ven thành phố Huế được nuôi cấy trên môi trường EMB lỏng để phân lập vi khuẩn *E. coli* (Quinn, 1994). Thành phần môi trường EMB (pepton: 10 g, lactoza: 0,5 g, sacaroza: 5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,2 g, dung dịch eozin-metyla 8%: 5 ml, dung dịch xanh metylen 1,3%: 5 ml, nước cất: 1000 ml). Khuấy đều môi trường, chia vào các ống nghiệm sau đó hấp khử trùng 121°C/15 phút.

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

- ADN của các giống *E. coli* chuẩn: 281: LT+, 256: STa+, STb+, 391: VT2e do Phân viện Thú y miền Trung cung cấp. Nguyên liệu dùng cho phản ứng PCR (Polymerase chain reaction - phản ứng chuỗi tổng hợp) (Primer, IQ supermix, Taq enzyme) do công ty Biorad cung cấp. Trình tự các cặp mỗi

<sup>1</sup>Trường Đại học Nông Lâm Huế



*E. coli* mang  $\geq 2$  trong số 4 gen nói trên. Số liệu ở bảng 3 cho thấy các chủng *E. coli* nghiên cứu thuộc các tổ hợp gen mã hóa 2 hoặc 3 nhóm độc tố sau: Tổ hợp 2 gen gồm có STa/STb chiếm tỷ lệ 1/19 (5,3%), STa/VT2e 2/19 (10,5%) và cao nhất là STb/LT 11/19 (57,89%).

Tổ hợp 3 gen gồm có STa/STb/VT2e chiếm tỷ lệ 1/19 (5,3%), STa/LT/VT2e 1/19 (5,3%), STb/LT/VT2e 2/19 (10,5%), và tổ hợp 4 gen STa/STb/VT2e/LT 1/19 (5,3%).

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

TT	Gen kiểm tra	Chủng mang gen có 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

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

Ở mẫu bệnh phẩm tìm tỷ lệ dương tính với một trong các yếu tố độc lực là 4/6 (66,67%), ở ruột là 3/6 (50%) và ở phân là 20/49 (40,82%). Tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen LT cao nhất 25/61 (40,98%), kế tiếp là gen STb 17/61 (27,87%), gen STa 9/61 (14,75%), và sau cùng là VT2e 6/61 (9,84%). Tổ hợp 2 gen gồm có: gen

STa/STb chiếm tỷ lệ 1/19 (chiếm 5,3%), STa/VT2e là 2/19 (10,5%), và cao nhất là STb/LT 11/19 (57,89%).

Tổ hợp 3 gen gồm có: STa/STb/VT2e 1/19 (5,3%), STa/LT/VT2e 1/19 (5,3%), cao nhất là STb/LT/VT2e 2/19 (10,5%), và tổ hợp 4 gen STa/STb/VT2e/LT 1/19 (5,3%).

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

- 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., 1997. *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, 2958-2963.
- Vũ Khắc Hùng, 2005. *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.* Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y. Tập XII, số 2, trang 54-61.
- Pham H. S., Kiuchi A. and Tabuchi K., 1999. *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, 829-836.
- Quinn P. J., Markey B. and Carter G. R., 1994. *Clinical veterinary microbiology.* Wolfe.

IDENTIFICATION OF COMMON TOXINS OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM DIARRHEIC PIGLET BY POLYMERASE CHAINE REACTION (PCR)

Nguyen Xuan Hoa, Le Van Phuoc, Phạm Quang Trung  
Ho Le Quynh Chau, Le Xuan Anh

Summary

The study of toxin-producing genes STa, STb, LT, VT2e of strains of *E. coli* isolated in Thua Thien - Hue province presented the following results: in the heart, the rate of samples positive for a virulence factor is 4/6 (66.67%), in the intestine is 3/6 (50%) and the distribution is 20/49 (40.82%). *E. coli* LT gene is the highest with 25/61 (40.98%), followed by the STb gene with 17/61 (27.87%), then the STa gene with a rate of 9/61 (14.75%), and finally the VT2e gene with 6/61 (9.84%). The complex consisting on two genes presented these results: genes STa/STb, in a proportion of 1/19 (up 5.3%), STa/VT2e in 2/19 (10.5%), and the highest proportion is STb / LT with 11/19 (57.89%). For the complex consisting on three genes the results were: STa/STb/VT2e, STa/LT/VT2e and STa/STb/VT2e/LT comprises with a proportion of 1/19 (5.3%), and STb/LT/VT2e with the highest proportion 2/19 (10.5%).

Keywords: Toxin - producing gene, toxin of intestine, toxin VT2.

Người phản biện: PGS.TS. Trần Tiến Dũng