

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ GEN ĐỘC LỰC CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN *E. COLI* PHÂN LẬP TỪ GÀ BỊ TIÊU CHẢY TẠI THÁI NGUYÊN VÀ NAM ĐỊNH

Trần Thị Thu Hằng, Lê Thị Hồng Nhung và Lưu Quỳnh Hương

Viện Thú y, Hà Nội, Việt Nam

Tác giả liên hệ: Lưu Quỳnh Hương, Điện thoại: 0914649774, Email: lqhuongvet@yahoo.com

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác định một số gen độc lực phổ biến của vi khuẩn Diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC) trên đàn gà nuôi, là tác nhân quan trọng gây ra bệnh tiêu chảy trên thế giới. Chúng tôi đã thu thập 60 mẫu phân gà có biểu hiện tiêu chảy tại các trại chăn nuôi gà tại hai tỉnh Thái Nguyên và Nam Định. Tỷ lệ phân lập *E. coli* từ các mẫu thu được là 100%. Bằng phương pháp PCR, chúng tôi đã xác định được tất cả các chủng *E. coli* phân lập được đều mang gen đặc trưng loài *16S rRNA*; chỉ có 6,67% các chủng là mang gen *stx2* và không có chủng phân lập nào được xác định mang các gen *escV*, *ent*, *stx1* và *eaeA*. Kết quả cho thấy phân gà là nguồn tiềm tàng vi khuẩn DEC, có thể ô nhiễm thân thịt gà trong quá trình giết mổ và gây nguy hiểm cho sức khỏe người tiêu dùng.

Từ khóa: Gà, *E. coli*, *escV*, *ent*, *stx1*, *stx2*, *eaeA*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại Việt Nam, chăn nuôi gia cầm cũng như chăn nuôi gà là một nghề sản xuất truyền thống. Tại nhiều địa phương, chăn nuôi gia cầm/gà đã trở thành một trong những nghề sản xuất chính trong sản xuất nông nghiệp, góp phần làm thay đổi cơ cấu các ngành sản xuất trong nông nghiệp và góp phần giúp xóa đói giảm nghèo bền vững. Trong đó, Thái Nguyên và Nam Định là hai tỉnh chăn nuôi gà lớn và lâu đời của vùng đồng bằng Bắc Bộ.

Ở Miền Bắc Việt Nam nói chung và Thái Nguyên, Nam Định nói riêng, khí hậu biến đổi thường biến đổi nhiều trong một năm, do vậy trong quá trình chăn nuôi gia cầm nếu không đảm bảo thức ăn, nguồn nước, vệ sinh chuồng trại cũng như môi trường xung quanh thì nguy cơ mắc các bệnh đường ruột, đường hô hấp và một số bệnh khác cao. Trong đó, bệnh tiêu chảy là bệnh khá phổ biến trong quá trình nuôi, đặc biệt là bệnh do vi khuẩn *E. coli* gây ra trên gia cầm nói chung và trên gà nói riêng. Bệnh nhiễm khuẩn *E. coli* gây thiệt hại lớn cho người chăn nuôi với tỉ lệ gây chết cao với tỷ lệ 20 - 60%, gia cầm trên 1 tháng có thể bị nhẹ và ít chết.

Vi khuẩn *E. coli*, đặc biệt là các chủng O1, O2, O76,... có các yếu tố bám dính và sinh độc tố là tác nhân gây ra nhiều chủng bệnh khác nhau trên gia cầm như viêm đường tiêu hóa (colibacillosis), nhiễm trùng huyết (colisepticemia), viêm tích tụ tế bào bạch cầu (coligranuloma), viêm màng bụng (peritonitis), viêm vòi trứng (salpingitis), viêm màng hoạt dịch, viêm khớp (synovitis)... Ngoài ra, *E. coli* còn được biết đến là một vi khuẩn cơ hội, gây bệnh kể phát khi gia cầm bị stress hay nhiễm những bệnh khác làm cho hệ miễn dịch suy yếu. Kể phát *E. coli* thường làm bệnh trầm trọng hơn nhiều và gây thiệt hại kinh tế lớn trong chăn nuôi công nghiệp.

Trong đó, Diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC) là tác nhân quan trọng gây ra bệnh tiêu chảy lưu hành trên thế giới. DEC có thể chia thành nhiều nhóm dựa trên các yếu tố quyết định độc lực riêng biệt của chúng như nhóm *E. coli* gây bệnh đường ruột (EPEC), nhóm *E. coli* sinh độc tố Shiga (SPEC)... (Bonkougou và cs, 2012). Các nhóm DEC không thể được xác định và kết luận thông qua các xét nghiệm vi sinh thông thường mà phải dựa vào sự kết hợp của các xét nghiệm sinh hóa, các phương pháp huyết thanh học và các phương pháp sinh học

phân tử. Những *E. coli* có sự hiện diện của các gen *stx1*, *stx2* được cho là nhóm SPEC. Nhóm EPEC được đặc trưng bởi sự hiện diện của gen *eae*. Sản phẩm của gen *eae* cho phép vi khuẩn gắn và tạo ra các hiệu ứng trên tế bào biểu mô ruột... (Li và cs, 2018)

Mặc dù có nhiều lợi thế để phát triển nhưng ngành chăn nuôi gia cầm của Việt Nam nói chung cũng như tại hai tỉnh Nam Định và Thái Nguyên nói riêng chưa phát huy hết tiềm năng và còn bộc lộ nhiều hạn chế. Trong đó, công tác kiểm soát dịch bệnh chưa thật sự hiệu quả đã khiến ngành chăn nuôi gia cầm chịu nhiều tổn thất nặng nề, gây thiệt hại cho người chăn nuôi. Việc đảm bảo an toàn dịch bệnh trong chăn nuôi, đem đến những sản phẩm chăn nuôi sạch, an toàn cho người tiêu dùng là mục tiêu hướng đến của ngành chăn nuôi.

Từ những cơ sở trên, chúng tôi đã tiến hành thu thập các mẫu phân của gà có biểu hiện tiêu chảy ở hai tỉnh Thái Nguyên và Nam Định để phân lập vi khuẩn *E. coli* và xác định một số gen độc lực của các chủng vi khuẩn phân lập được.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Mẫu

Sáu mươi mẫu phân gà có biểu hiện tiêu chảy thu thập từ một số trang trại chăn nuôi gà tại huyện Phú Bình, tỉnh Thái Nguyên và huyện Vụ Bản, tỉnh Nam Định trong thời gian từ tháng 1 đến tháng 5 năm 2021. Mỗi tỉnh thu thập 30 mẫu.

Môi trường hóa chất

MacConkey agar, EMB agar, Nutrient agar, Buffered pepton water, TSI agar, Urea Indole medium, Kovacs reagent, Brain Heart Infusion.....

Bộ KIT Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher, Mỹ); Ethanol absolute (Merck, Mỹ); 2X PCR Master Mix (Thermo Fisher, Mỹ); DNA gel loading dye (Thermo Fisher, Mỹ); Agarose (bio World, Mỹ); GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher, Mỹ); Redsafe (Intron, Hàn Quốc), TBE buffer 10X (bio World, Mỹ), UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Thermo Fisher, Mỹ), các cặp môi (Sigma-Aldrich, Singapore).

Nội dung nghiên cứu

Phân lập vi khuẩn *E. coli* từ mẫu phân gà bị tiêu chảy thu thập từ một số trang trại tại hai tỉnh Thái Nguyên và Nam Định

Xác định gen độc lực *escV*, *ent*, *stx1*, *stx2*, *eaeA* của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp lấy mẫu và bảo quản mẫu: Lấy mẫu phân gà có biểu hiện tiêu chảy ở 5 vị trí khác nhau gộp lại thành 1 mẫu. Bảo quản mát, vận chuyển về phòng thí nghiệm phân tích mẫu trong ngày.

Phương pháp phân lập và nuôi cấy vi khuẩn E. coli: Theo ISO 13136:2012

Phương pháp kiểm tra sinh hóa vi khuẩn E. coli: Theo TCVN 7686:2007

Phương pháp tách chiết DNA: DNA tổng số của vi khuẩn được chiết tách bằng kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất, “GenJET Genomic DNA Purification Kit” (Thermo Scientific).

Phương pháp khẳng định lại gen đặc trưng loài *16S rRNA*

Trình tự các cặp mồi (Bảng 1)

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mồi	Trình tự	Kích thước (kp)	Tài liệu tham khảo
1	E16S	F ATCAACCGAGATTCCTCCAGT	231 bp	(SUN và cs., 2011)
		R TCACTATCGGTCAGTCAGGAG		

Thành phần phản ứng PCR: Sử dụng phản ứng PCR đơn mồi (singleplex PCR). Tổng lượng phản ứng là 25µl/phản ứng, bao gồm: 12,5 µl Master Mix; 1 µl mồi xuôi; 1 µl mồi ngược; 1 µl DNA mẫu và lượng nước vừa đủ (nồng độ mồi 10 pmol/µl).

Chu trình nhiệt: Biến tính ban đầu 95°C trong 5 phút, tiếp đó là 35 chu kỳ (biến tính 95°C trong 60 giây; gắn mồi 50°C trong 50 giây; kéo dài 72°C trong 60 giây) và cuối cùng là giai đoạn kéo dài ở 72°C trong 10 phút.

Phương pháp xác định các gen độc lực bằng phản ứng PCR

Trình tự các cặp mồi (Bảng 2)

Bảng 2. Trình tự các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mồi	Trình tự	Kích thước (kp)	Tài liệu tham khảo
1	escV	F GGCTCTCTTCTTCTTTATGGCTG	534 bp	
		R CCTTTTACAAACTTCATCGCC		
2	ent	F TGGGCTAAAAGAAGACACACTG	629 bp	
		R CAAGCATCCTGATTATCTCACC		
3	stx1	F ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180 bp	(Bako và cs., 2017)
		R AGAACGCCACTGAGATCATC		
4	stx2	F GGCAGTGTCTGAAACTGCTCC	255 bp	
		R TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
5	eaeA	F GACCCGGCACAAGCATAAGC	384 bp	
		R CCACCTGCAGCAACAAGAGG		

Thành phần phản ứng PCR: Sử dụng phản ứng PCR đa mồi (multiplex PCR). Tổng lượng phản ứng là 25µl/phản ứng, bao gồm: 12,5 µl Master Mix; 5 µl hỗn hợp mồi; 2 µl mẫu và lượng nước vừa đủ (nồng độ mồi 10 pmol/µl).

Chu trình nhiệt: Biến tính ban đầu 98°C trong 30 giây, tiếp đó là 35 chu kỳ (biến tính 98°C trong 30 giây; gắn mồi 62°C trong 60 giây; kéo dài 72°C trong 90 giây) và cuối cùng là giai đoạn kéo dài ở 72°C trong 10 phút.

Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập vi khuẩn *E. coli* từ các mẫu phân gà có biểu hiện tiêu chảy thu thập từ một số trang trại tại Thái Nguyên và Nam Định

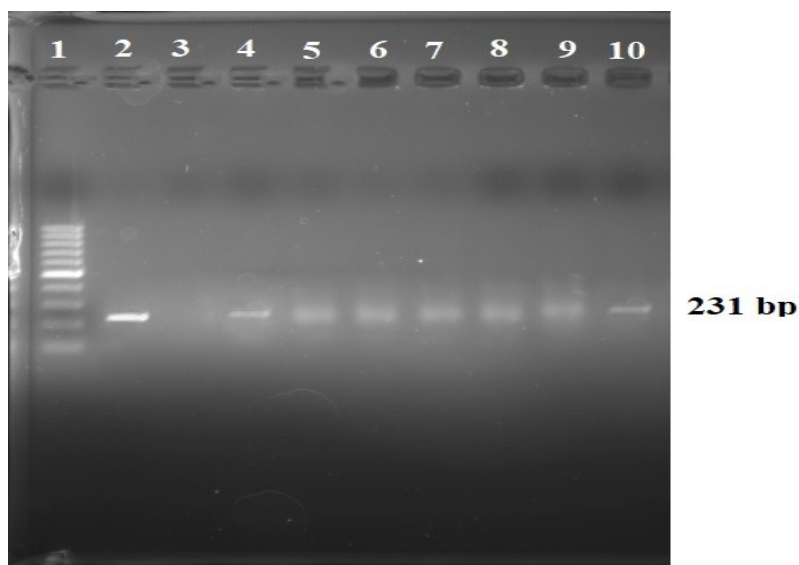
Từ 60 mẫu phân gà có biểu hiện tiêu chảy, chúng tôi đã tiến hành phân lập vi khuẩn *E. coli* theo tiêu chuẩn ISO 13136:2012. Kết quả được trình bày tại Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phân lập vi khuẩn *E. coli* và xác định gen đặc trưng loài *16S rRNA*

TT	Địa điểm	Số mẫu (n)	<i>E. coli</i>		<i>16S rRNA</i>	
			(+)	%	(+)	%
1	Thái Nguyên	30	30	30	30	30
2	Nam Định	30	30	30	30	30
Tổng		60	60	100	60	60

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy ở một số trại gà tại Nam Định và Thái Nguyên, tỷ lệ phân lập *E. coli* đạt 100%.

Để khẳng định chắc chắn các chủng *E. coli* trên chúng tôi tiến hành chạy PCR xác định gen *16S rRNA* đặc trưng cho loài. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3 và Hình 1.



Hình 1. Kết quả điện di đồ sản phẩm PCR với cặp mồi *16S rRNA*

Ghi chú: Giếng 1: Marke 100 bp; Giếng 2: Đối chứng dương; Giếng 3: Đối chứng âm; Giếng 4 đến giếng 10: Các chủng *E. coli* phân lập được

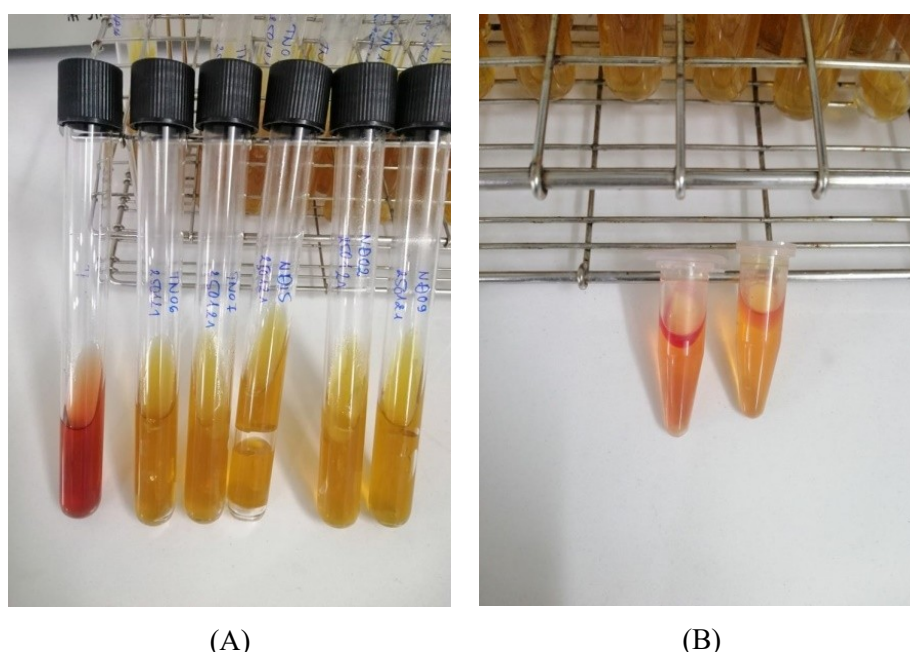
Kết quả cho thấy 100% các chủng *E. coli* phân lập được đều mang gen đặc trưng loài *16S rRNA*. Qua đây, có thể khẳng định các chủng phân lập được đều là các chủng *E. coli*.

Chúng tôi cũng đã tiến hành kiểm tra một số đặc tính sinh hóa đặc trưng của 60 chủng *E. coli* phân lập được

Kết quả kiểm tra sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được được trình bày trên Bảng 4 và Hình 2.

Bảng 4. Kết quả kiểm tra sinh hóa các chủng *E. coli* phân lập được

Đặc tính sinh hóa	<i>E. coli</i> (n=60)	
	(+)	(+)
Glucose	60	60
Lactose	60	60
Sucrose	60	60
Sinh hơi	60	60
H ₂ S	0	0
Urea	0	0
Indole	60	60



Hình 2. Một số hình ảnh kết quả thử sinh hóa của các chủng *E. coli*

Ghi chú: (A): Các chủng *E. coli* trên môi trường TSI; (B): Các chủng *E. coli* trên môi trường Urea Indole

Số liệu Bảng 4 cho thấy: 100% các chủng *E. coli* phân lập được đều lên men đường glucose, đường lactose và đường sucrose. Các chủng này đều không sinh H₂S; dương tính với indole và sinh hơi trong quá trình lên men đường.

Như vậy, đặc tính sinh vật hóa học của các chủng *E. coli* phân lập được đều mang các đặc điểm chung của giống *E. coli*, phù hợp với những đặc điểm về các đặc tính sinh vật, hóa học như những tài liệu trong và ngoài nước đã mô tả (Hussain và cs., 2013).

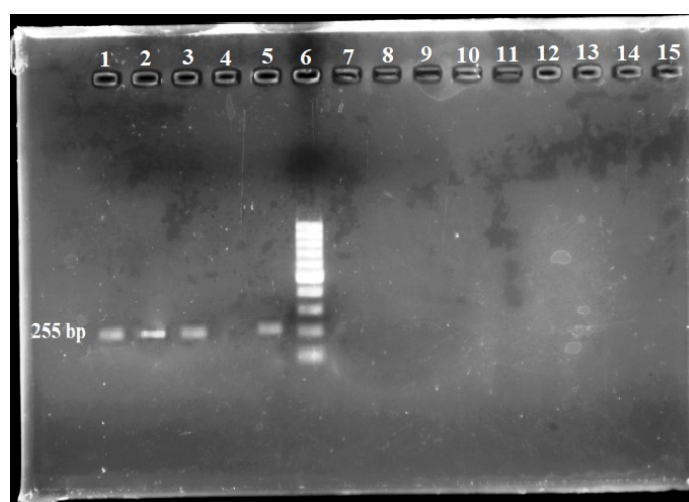
Kết quả xác định một số gen độc lực của các chủng *E. coli* phân lập được

Các chủng *E. coli* phân lập được xác định sự có mặt của các gen độc lực, bao gồm gen mã hóa intimin – gắn và kết dính các tế bào ruột (*eaeA*), gen mã hóa một protein màng không thể tách rời (*escV*), gen *ent* và các gen độc tố Shiga (*stx1* và *stx2*) bằng PCR. Đây là một số tiêu chí để xác định các nhóm *E. coli* gây bệnh đường ruột (EPEC) và nhóm *E. coli* sinh độc tố Shiga

(STEC). Cụ thể, đối với nhóm EPEC là sự hiện diện của các gen *eaeA*, *escV* và gen bổ sung *ent*; đối với STEC, sự hiện diện của cả hai gen *stx1* và gen *stx2* hoặc của một trong hai gen này và các gen bổ sung có thể có *eaeA*, *escV*, *ent* (Bonkougou và cs., 2012). Kết quả được trình bày tại Bảng 5 và Hình 3.

Bảng 5. Kết quả xác định một số gen độc lực của các chủng *E. coli* phân lập được

Địa điểm	Số chủng phân lập (n)	<i>escV</i>		<i>ent</i>		<i>eaeA</i>		<i>stx1</i>		<i>stx2</i>	
		(+)	%	(+)	%	(+)	%	(+)	%	(+)	%
Thái Nguyên	30	0	0	0	0	0	0	0	0	4	10
Nam Định	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tổng	60	0	0	0	0	0	0	0	0	4	6,67



Hình 3. Kết quả điện di đồ sản phẩm PCR với các cặp mồi *escV*, *ent*, *stx1*, *stx2*, *eaeA*

Ghi chú: Giếng 6: Marker 100 bp; Giếng 1 đến giếng 5 và giếng 7 đến giếng 14: Các chủng *E. coli* phân lập được; Giếng 15: Đối chứng âm

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy rằng trong 60 chủng được kiểm tra, chỉ có duy nhất 4 chủng phân lập từ các trại gà ở Thái Nguyên có mang gen độc tố Shiga *stx2*, chiếm tỷ lệ 6,7%. Theo Trần Trung Tú và cộng sự, vào năm 2018 từ các trại gà tại một số tỉnh đồng bằng Sông Cửu Long, bằng kỹ thuật PCR đã xác định được 24 chủng *E. coli* mang gen *stx1* (33,3%), 32 chủng *E. coli* mang gen *stx2* (44,4%) và có 19 chủng *E. coli* mang cả hai gen độc lực (26,4%) (Trần Trung Tú và cs, 2018). Tỷ lệ trên cao hơn so với tỷ lệ trong nghiên cứu này, tuy nhiên kết quả của chúng tôi cũng cho thấy tỷ lệ xuất hiện của các chủng *E. coli* mang gen *stx2* cao hơn so với tỷ lệ các chủng mang gen *stx1* và các chủng mang cả hai gen độc *stx1* và *stx2*.

KẾT LUẬN

Từ 100 hộ chăn nuôi gà được phỏng vấn tại hai tỉnh Thái Nguyên và Nam Định, chúng tôi đã thu thập được 60 mẫu phân gà có biểu hiện tiêu chảy. 100% các mẫu phát hiện được vi khuẩn *E. coli*.

Sáu mươi chủng *E. coli* phân lập được đều mang gen đặc trưng *16S rRNA*, không có chủng nào mang các gen *escV*, *ent*, *stx1*, *eaeA* và chỉ có 04/60 chủng phân lập được xác định có mang gen *stx2*, chiếm tỷ lệ 6,67%.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin chân thành cảm ơn các cán bộ thuộc Chi cục Chăn nuôi, Thú y và Thủy sản Thái Nguyên và Chi cục Chăn nuôi và Thú y Nam Định đã giúp đỡ để chúng tôi lấy mẫu xét nghiệm trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

Trần Trung Tú, Trương Thị Bích Vân và Nguyễn Trọng Ngữ. 2018. Khả năng phân giải vi khuẩn *Escherichia coli* của thực khuẩn thể phân lập từ các trại gà ở một số tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Chăn nuôi 233, tr. 83-89.

Tiếng nước ngoài

Bako, E., Kagambèga, A., Traore, K.A., Bagre, T.S., Ibrahim, H.B., Bouda, S.C., Bonkougou, I.J.O., Kaboré, S., Zongo, C. and Traore, A.S. 2017. Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated in organic waste products (Cattle fecal matter, manure and, slurry) from cattle's markets in Ouagadougou, Burkina Faso. International journal of environmental research and public health 14, 1100.

Bonkougou, I., Lienemann, T., Martikainen, O., Dembelé, R., Sanou, I., Traoré, A., Siitonen, A., Barro, N. and Haukka, K. 2012. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in children with and without diarrhoea in Burkina Faso. Clinical Microbiology and Infection 18, 901-906.

Li, D., Shen, M., Xu, Y., Liu, C., Wang, W., Wu, J., Luo, X., Jia, X. and Ma, Y. 2018. Virulence gene profiles and molecular genetic characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* from a hospital in western China. Gut pathogens, 10(1), pp.1-11.

Hussain, T., Roohi, A., Munir, S., Ahmed, I., Khan, J., Edel-Hermann, V., ... and Anees, M. 2013. Biochemical characterization and identification of bacterial strains isolated from drinking water sources of Kohat, Pakistan. African Journal of Microbiology Research, 7(16), pp. 1579-1590.

SUN, D.-b., Rui, W., HE, X.-j., Shuang, W., LIN, Y.-c., Xu, H., WANG, Y.-q., GUO, T.-t., WU, G.-j. and YANG, K.-l., 2011. Development of a multiplex PCR for diagnosis of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* from cows with endometritis. Agricultural Sciences in China 10, pp. 1624-1629.

ABSTRACT

Prevalence of some *E. coli* virulence genes from diarrheagenic chickens in Thai Nguyen and Nam Dinh provinces

The study aims to identify some common virulence genes of Diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC) in domestic chicken flocks, which are important causative agents of diarrhea in the world. We have collected 60 samples feces of chickens with diarrhea from Thai Nguyen and Nam Dinh provinces. The rate of isolation of *E. coli* was 100%. By PCR method, we have determined that all of the isolated strains carried the *16S rRNA* genes; only 6,67% of the strains carried the *stx2* gene and none of the strains carried the *escV*, *ent*, *stx1* and *eaeA* genes. The results showed that feces of chicken is a potential source of DEC, which can contaminate chicken carcasses during slaughter and pose a health risk for consumers.

Keywords: Chicken, *E. coli*, *escV*, *ent*, *stx1*, *stx2*, *eaeA*

Ngày nhận bài: 25/9/2022

Ngày phản biện đánh giá: 20/10/2022

Ngày chấp nhận đăng: 31/10/2022

Người phản biện: TS. Phạm Doãn Lâm