

THIẾT LẬP PHẢN ỨNG PCR ỨNG DỤNG TRONG GIÁM ĐỊNH VI KHUẨN *E.COLI* GÂY DUNG HUYẾT PHÙ ĐẦU Ở LỢN CON

**A study on PCR application for identifying hemorrhagic *E.coli* causing oedema disease
in post - weaning pigs**

Lê Văn Lành¹, Huỳnh Thị Mỹ Lệ¹, Lê Huỳnh Thanh Phương²

¹Khoa Thú y, Đại học Nông nghiệp Hà Nội

²Phòng Khoa học Công nghệ & Hợp tác quốc tế, Đại học Nông nghiệp Hà Nội

SUMMARY

A study was conducted using PCR technique for identifying hemorrhagic *E.coli* causing oedema disease in post-weaning pigs. PCR conditions were set up to determine Verotoxin gene. Results revealed that up to 100% of oedema-suspected pigs were positive to *E.coli*. Examining 10 isolated strains showed that 9 strains killed genuine pigs with specific clinical symptoms and pathologic changes, were 6 strains had both heat stable and heat labile toxins. Meanwhile, 7 strains had ability to attach to Vero cells. Applying PCR using VT1 and VT2 primers could amplify 2 specific genes with the according length of 210bp and 417bp. The PCR percentage positive to haemorrhagic *E.coli* in randomized samples was 64.29%.

Key words: Oedema disease, haemorrhagic *E.coli*, pathogenic factors, PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong các bệnh ở lợn con sau cai sữa, bệnh phù đầu gây ra bởi các chủng *E.coli* O138, O139, O141, sản sinh độc tố verotoxin VT2e là khá phổ biến với tỷ lệ chết lên tới 61,44% (Nguyễn Kim Lan, 2002).

Để kết luận chủng *E.coli* gây dung huyết đòi hỏi chỉ ra hai yếu tố độc lực: (i) yếu tố bám dính, (ii) độc tố verotoxin. Theo kết quả nghiên cứu của Wang và cộng sự (2005), xác định chủng *E.coli* thông qua định tít huyết thanh bị gây “nhiều” bởi kháng nguyên giống kháng nguyên vỏ của vi khuẩn (capsular-like bacterial surface antigens) do đó hạn chế độ đặc hiệu của phản ứng. Trái lại, sử dụng phương pháp PCR phát hiện gen mã hóa cho sản sinh kháng nguyên bám dính và độc tố của vi khuẩn cho phép xác định nhanh với độ chính xác cao các serotíp *E.coli* gây bệnh.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết lập và tối ưu hóa một số điều kiện của phản ứng PCR để giám định vi khuẩn *E.coli* dung huyết từ lợn bệnh. Cơ sở của phương pháp là xác định sự có mặt của các gen quyết định sản sinh 2 yếu tố độc lực (F18 và VT2e_ Shiga toxin 2e).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu bệnh phục vụ nghiên cứu: bệnh phẩm lợn tiêu chảy thu thập tại các huyện Chương Mỹ (Hà Tây), Vụ Bản (Nam Định), Văn Lâm (Hưng Yên) và Gia Lâm (Hà Nội). Mẫu bệnh được tập trung lấy trên những lợn bệnh với biểu hiện: tiêu chảy, phù mắt và co giật (do lợn con mắc bệnh phù đầu thường có triệu chứng lâm sàng đặc trưng). Mẫu bệnh phẩm được thu thập gồm: phân và ruột non.

Vi khuẩn được phân lập trên môi trường thạch Macconkey, tiến hành kiểm tra khả năng lên men sinh hơi một số loại đường của vi khuẩn *E.coli* phân lập được.

Để đánh giá khả năng gây bệnh của vi khuẩn *E.coli* phân lập được, chọn ngẫu nhiên 10 chủng *E.coli* phân lập từ lợn bệnh, tiêm vào xoang phúc mạc chuột thí nghiệm canh khuẩn với liều 0,1ml/con. Chuột thí nghiệm là chuột bạch có trọng lượng 18-20g/con. Các yếu tố độc lực được xác định bằng các phương pháp: (1) tiêm động vật thí nghiệm, (2) khuếch tán trên da thỏ và (3) kiểm tra khả năng bám dính trên tế bào Vero. Thỏ thí nghiệm là những con thỏ khỏe mạnh có khối lượng từ 2- 2,5kg/con.

Phương pháp khuếch tán trên da thỏ được sử dụng để kiểm tra khả năng sản sinh độc tố của 10 chủng *E.coli* kể trên. Đọc kết quả sau 2 giờ tiêm Evan blue trên cơ sở xác định diện tích vùng da màu xanh do thẩm xuất thuốc nhuộm. Bên cạnh khả năng sản sinh độc tố, yếu tố bám dính là yếu tố tiên quyết cho khả năng gây bệnh của vi khuẩn *E.coli*. Trong phòng thí nghiệm, yếu tố này được xác định thông qua khả năng bám dính của vi khuẩn lên thảm tế bào Vero. Đánh giá khả năng bám dính của vi khuẩn *E.coli* phân lập được như sau: những chủng vi khuẩn có khả năng bám dính sẽ làm cho thảm tế bào Vero bị rách, không bám vào bề mặt chai nuôi cấy và ngược lại,

những chủng không có khả năng bám dính sẽ không phá hủy tế bào, do vậy thảm tế bào Vero sẽ mịn đều, tương đương đối chứng âm.

Trong nghiên cứu này, phương pháp tách chiết ADN từ genome vi khuẩn và phương pháp PCR đã được sử dụng. Trong điều kiện bước đầu thiết lập phương pháp chẩn đoán, thiết lập PCR được xác định riêng rẽ từng gen mã hóa độc tố của vi khuẩn, dùng chủng vi khuẩn *E.coli* gây dung huyết do Viện Thú y cung cấp làm tham chiếu. Các mẫu *E.coli* gây bệnh phân lập lựa chọn thực hiện PCR gồm: Vụ Bản 1, Văn Lâm 1, Chương Mỹ 2 và Gia Lâm 1.

Sinh phẩm, hóa chất cho PCR. Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu gồm:

Tên môi	Trình tự	Kích thước band dự kiến (bp)
VT1	5' GAC TCT TCC ATC TGC G 3' 5' AGT TAA TGT GGT GGC CGA 3'	210
VT2	5' TTC GGT ATC CTA TTC CCG 3' 5' TCT CTG GTC ATT GTA TTA 3'	471

Điện di sản phẩm PCR bằng agarose gel 2%.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn

Trên các lợn con mắc bệnh, gần 100% mẫu bệnh phẩm có mặt của *E.coli*.

Cụ thể: 100% mẫu thu thập ở Vụ Bản, Văn Lâm và Chương Mỹ dương tính.

Trong khi đó chỉ có 95% số bệnh phẩm tại Gia Lâm phân lập được vi khuẩn *E.coli*.

Bảng 1. Kết quả giám định khả năng lên men sinh hơi của *E.coli* phân lập

Địa phương	Tổng số mẫu	Loại đường							
		Saccarose		Galactose		Glucose		Lactose	
		Số mẫu	% (+)	Số mẫu	% (+)	Số mẫu	% (+)	Số mẫu	% (+)
Vụ Bản	54	0	0	54	100	53	98,15	54	100
Văn Lâm	73	0	0	71	97,26	73	100	70	95,89
Chương Mỹ	59	0	0	59	100	59	100	55	93,22
Gia Lâm	78	0	0	78	100	75	96,15	78	100

Giám định đặc tính lên men đường cho thấy: (1) 100% chủng vi khuẩn phân lập không lên men đường saccarose, (2) Hơn 93% số chủng phân lập lên men sinh hơi mạnh 3 loại đường là glucose, galactose và Lactose (Bảng 1). Căn cứ vào kết quả phân lập trên môi trường Macconkey và khả năng lên men sinh hơi đường, đã chứng tỏ sự có mặt của vi khuẩn *E.coli* ở hầu hết các mẫu bệnh phẩm.

3.2. Kết quả giám định độc lực của các chủng *E.coli* phân lập

Là vi khuẩn thường trực ở đường tiêu hóa, *E.coli* có mặt rất phổ biến ngay cả ở gia súc khỏe mạnh. Nghiên cứu của Schierack và cộng sự (2006) cho thấy 68,6% chủng *E.coli* phân lập từ lợn khỏe mang ít nhất một gen mã hóa độc tố đường ruột chịu nhiệt tít I và II (heat-stable enterotoxins I and II); độc tố đường ruột không chịu nhiệt tít I (heat-labile enterotoxin I); cũng như độc tố Shiga toxin 2e và yếu tố bám dính F4, F5, F6, F18, F41.

3.2.1. Kết quả xác định độc lực trên chuột bạch

Bảng 2a. Kết quả xác định độc lực của *E.coli* phân lập trên chuột bạch

TT	Mẫu	Số chuột tiêm	Số chuột chết	Thời gian chết (giờ)	Bệnh tích mổ khám
1	Vụ Bản 1	2	2	17-24	- Bụng chướng to, trướng hơi đường tiêu hóa
2	Vụ Bản 2	2	2	17	- Phổi viêm, sưng, xuất huyết
3	Văn Lâm 1	2	1	24	- Gan tụ huyết, ruột xuất huyết
4	Văn Lâm 2	2	2	17-18	
5	Chương Mỹ 1	2	1	17-18	
6	Chương Mỹ 2	2	1	17-18	
7	Gia Lâm 1	2	2	17-18	
8	Gia Lâm 2	2	0	-	
9	Gia Lâm 3	2	2	21	
10	Gia Lâm 4	2	1	21	

Kết quả ở bảng 2a cho thấy:

(1) Trong 10 chủng đem kiểm tra độc lực, có 9/10 chủng gây chết chuột với bệnh tích điển hình: bụng chướng to, phổi viêm xuất huyết, gan sưng tụ huyết, ruột xuất huyết.

(2) Có 5/10 chủng kiểm tra gồm: Vụ Bản 1, Vụ Bản 2, Văn Lâm 2, Gia Lâm 1 và Gia Lâm 3 giết chết 100% chuột thí nghiệm sau gây nhiễm 17- 24 giờ. Có 4 chủng phân lập giết chết 50% động vật thí nghiệm. Chỉ có 1 chủng phân lập (Gia Lâm 2) không giết chết chuột thí nghiệm.

Kết quả thử khả năng giết chết động vật thí nghiệm chứng tỏ rằng gần 100% chủng *E.coli*

phân lập từ lợn con bị phù đầu thuộc loại độc lực cao.

3.2.2. Kết quả xác định độc tố đường ruột

Các loại độc tố chịu nhiệt (heat stable toxin) và không chịu nhiệt (heat labile toxin) đóng vai trò quan trọng trong cơ chế sinh bệnh của vi khuẩn *E.coli* độc. Kết quả ở bảng 2b chỉ ra: có 6/10 chủng kiểm tra sản sinh cả 2 loại độc tố chịu nhiệt và không chịu nhiệt; 04 chủng còn lại không sản sinh độc tố. Kết quả xác định khả năng sản sinh độc tố chịu nhiệt và không chịu nhiệt một lần nữa khẳng định độc tính của vi khuẩn *E.coli* phân lập từ lợn con mắc phù đầu.

Bảng 2b. Kết quả xác định khả năng sinh độc tố bằng phản ứng khuếch tán trên da thỏ

TT	Mẫu	Loại độc tố		
		Không chịu nhiệt (LT)	Chịu nhiệt (ST)	Chịu nhiệt & không chịu nhiệt
1	Vụ Bản 1	+	+	+/+
2	Vụ Bản 2	+	+	+/+
3	Văn Lâm 1	-	-	-
4	Văn Lâm 2	+	+	+/+
5	Chương Mỹ 1	-	-	-
6	Chương Mỹ 2	-	-	-
7	Gia Lâm 1	+	+	+/+
8	Gia Lâm 2	+	+	+/+
9	Gia Lâm 3	-	-	+
10	Gia Lâm 4	+	+	+/+

3.2.3. Kết quả kiểm tra khả năng bám dính của *E.coli* trên tế bào Vero

Bảng 2c. Kết quả kiểm tra khả năng bám dính trên tế bào Vero

TT	Mẫu	Khả năng bám dính
1	Vụ Bản 1	+
2	Vụ Bản 2	+
3	Văn Lâm 1	-
4	Văn Lâm 2	+
5	Chương Mỹ 1	+
6	Chương Mỹ 2	-
7	Gia Lâm 1	-
8	Gia Lâm 2	+
9	Gia Lâm 3	+
10	Gia Lâm 4	+

Trong các chủng vi khuẩn được kiểm tra, có 7/10 chủng mang yếu tố bám dính; 3 chủng không có khả năng bám dính là Văn Lâm 1, Chương Mỹ 2 và Gia Lâm 1. Trong 3 chủng này 2 chủng là Văn Lâm 1, Chương Mỹ 2 cho kết quả âm tính khi kiểm tra khả năng sản sinh độc tố chịu nhiệt và không chịu nhiệt (Bảng 2c).

3.3. Thiết lập phản ứng PCR giám định *E.coli* gây dung huyết phù đầu

Các kết quả giám định yếu tố độc lực của *E.coli* theo phương pháp thường quy ở phần 3.2.1 đến 3.2.3 cho thấy: khi kiểm tra bằng các phương pháp khác nhau vẫn có một tỷ lệ nhất

định lúc này hay lúc khác không biểu hiện đầy đủ yếu tố gây bệnh. Hơn nữa, quyết định thể hiện các yếu tố độc lực của vi khuẩn gây bệnh do gen quy định. Vì vậy, để kết luận chính xác, cần xác định gen mã hóa sản sinh các yếu tố độc lực bằng phương pháp PCR.

Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu dùng duplex PCR hoặc multiplex PCR để xác định gen mã hóa các yếu tố độc lực của *E.coli* (Botteldoorn et al., 2003) với ưu điểm xác định nhanh, chính xác và đồng thời nhiều gen mã hóa độc tố của *E.coli*.

3.3.1. Kết quả tách chiết ADN của vi khuẩn

Bảng 3a. Kết quả xác định nồng độ ADN tổng số bằng máy quang phổ

Mẫu	A260	A280	A260/A280	Nồng độ ADN (ug/ml)
Vụ Bản 1	0,185	0,096	1,927	0,463
Văn Lâm 1	0,176	0,099	1,778	0,440
Chương Mỹ 2	0,094	0,051	1,843	0,235
Gia Lâm 1	0,182	0,094	1,936	0,455
Viện thú y E30	0,173	0,091	1,901	0,433
Viện thú y Sa3	0,096	0,055	1,745	0,240
Viện thú y Em4	0,115	0,063	1,825	0,288

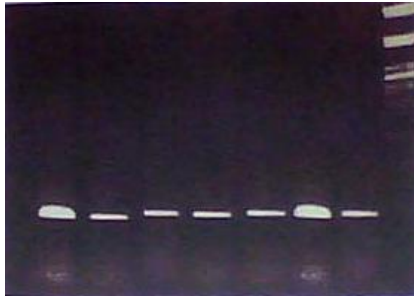
Sau khi tách chiết và tinh sạch ADN, quang phổ và nồng độ ADN đã được xác định. Các mẫu ADN tách chiết đều có tỷ số A260/A280 > 1,7 (Bảng 3a). Như vậy, chất lượng ADN đảm bảo độ tinh sạch và lượng phù hợp cho phân tích PCR.

3.3.2. Kết quả PCR xác định gen mã hóa độc tố

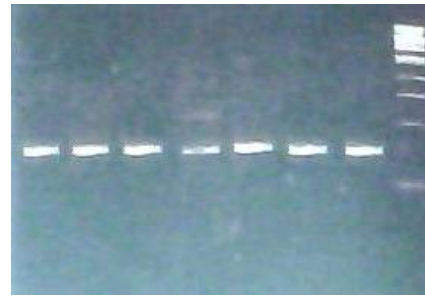
Để đảm bảo độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng PCR, nồng độ của sinh phẩm, hóa chất sử dụng phải phù hợp. Sau các phản ứng được thiết lập (kết quả không trình bày), nồng độ các thành phần của PCR được xác định như sau:

Bảng 3b. Thành phần phản ứng PCR xác định gen mã hóa yếu tố độc lực của *E.coli*

Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μl)
Nuclease free water		10
PCR 10X buffer	10mM	2,0
dNTPs	2,5mM	2,0
MgCl ₂	2,0mM	2,5
Primer (xuôi, ngược)	10pM	3,25
ADN khuôn mẫu	A260/A280 > 1,7	5,0
Taq DNA polymerase	2U/μl	0,25
	Tổng	25



Phản ứng PCR dương tính với môi VT1



Phản ứng PCR dương tính với môi VT2

Hình 1. Phản ứng PCR với môi VT1 và VT2

Kết quả thực hiện đối với 2 cặp môi VT1 và VT2 với kích thước đoạn gen được nhân lên như thiết kế: dùng môi VT1 cho sản phẩm khoảng 210bp, dùng môi VT2 cho sản phẩm PCR khoảng 471bp (Hình 1). Kết quả thu được cho

thấy, nghiên cứu đã thiết lập và thực hiện thành công PCR trên các mẫu đối chứng dương chuẩn và trên các mẫu *E.coli* phân lập từ lợn bệnh.

3.4. Ứng dụng PCR xác định *E.coli* gây dung huyết phù đầu trên mẫu thu thập ngẫu nhiên

Bảng 4. Kết quả PCR xác định *E.coli* gây dung huyết phù đầu ở lợn

Đợt	Số mẫu	Số mẫu giết chuột bạch <24 giờ	Số mẫu PCR (+)	Tỷ lệ PCR dương tính (%)
Đợt 1	26	7	4	57,14
Đợt 2	23	7	5	71,43
Tổng	49	14	9	64,29

Với các mẫu được thu thập tại các lò mổ khu vực Hà Nội, tiến hành phân tích PCR với điều kiện như đã thiết lập, kết quả đã cho thấy PCR có kết quả dương tính trùng với những mẫu có độc lực giết chết chuột bạch (Bảng 4). Kết quả thí nghiệm khẳng định độ nhạy và độ đặc hiệu của PCR khi áp dụng xác định *E.coli* gây dung huyết phù đầu ở lợn.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được vi khuẩn *E.coli* từ các mẫu bệnh phẩm là phân, ruột non của lợn có triệu chứng phù đầu.

Trong số các chủng vi khuẩn *E.coli* được phân lập, có tới 70% số chủng *E.coli* phân lập được mang yếu tố bám dính khi thử trên tế bào Vero.

Thông qua việc xác định gen mã hóa yếu tố độc lực là verotoxin, đã thiết lập được phản ứng PCR để giám định *E.coli* gây dung huyết phù đầu.

Trong các điều kiện bước đầu, phương pháp PCR được ứng dụng trong giám định *E.coli* gây

dung huyết phù đầu ở các mẫu thu thập ngẫu nhiên, với tỷ lệ dương tính là 64,29%.

5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Kim Lan (2002). *Tình hình bệnh phù đầu của lợn con do E.coli ở một số địa phương thuộc tỉnh Thái Nguyên*. Khoa học kỹ thuật Thú y, tập X, số 1.
- Wang, L., B. Liu, et al. (2005). *Molecular markers for detection of pathogenic Escherichia coli strains belonging to serogroups O 138 and O 139*. Vet Microbiol 111(3-4): 181-90.
- Botteldoorn, N., M. Heyndrickx, et al. (2003). *Detection and characterization of verotoxigenic Escherichia coli by a VTEC/EHEC multiplex PCR in porcine faeces and pig carcass swabs*. Res Microbiol 154(2): 97-104.
- Schierack, P., H. Steinruck, et al. (2006). *Virulence factor gene profiles of Escherichia coli isolates from clinically healthy pigs*. Appl Environ Microbiol 72 (10): 6680-6686.