

## KHẢO SÁT TỶ LỆ NHIỄM VÀ XÁC ĐỊNH GENE KHÁNG KHÁNG SINH CỦA ENTEROTOXIGENIC *Escherichia coli* TRÊN HEO CON TIÊU CHẢY TẠI TỈNH VĨNH LONG VÀ ĐỒNG THÁP

Lý Thị Liên Khai<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hạnh Chi<sup>1</sup> và Nguyễn Thanh Lãm<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 09/01/2015

Ngày chấp nhận: 19/08/2015

### Title:

Survey on the infection rate and identification of antibiotics resistant genes of Enterotoxigenic *Escherichia coli* causing piglet diarrhea in Vinh Long and Dong Thap provinces

### Từ khóa:

Đồng Tháp, Vĩnh Long, ETEC, gene đề kháng, heo con, tiêu chảy

### Keywords:

Dong Thap, Vinh Long, ETEC, resistant gene, diarrhea piglet

### ABSTRACT

This study was conducted to identify strains, antimicrobial resistance and resistant genes of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in diarrheic piglets in Vinh Long and Dong Thap provinces. It was shown that, the ratio of diarrheic piglets was quite high (26.49%) and ETEC infection was found to be higher (97.27%) in suckling piglets than that of in weaning piglets (89.00%). The contamination of ETEC on the pig floor (67.85%) was higher than that in water (3.57%). There was significant difference of the prevalence of K88, K99 and 987P strains and among those, K88 strain was the most predominant strain isolated from piglets diarrhea (20.24%). K88 strain isolates were found in 23.36% of suckling piglets, more frequent as compared with weaning piglets (16.47%). In 196 positive samples, 263 ETEC strains were identified; 121 of these (121/588 isolated) (20.58%) were multi-infections in complicated diarrhea in piglets with 2-3 strains such as K88+K99 (6.46%), K99+987P (5.27%), K88+987P (6.12%) and K88+K99+987P (2.72%). ETEC strains were highly resistant to ampicillin, tetracycline and bactrim. Up to 134/152 strains were multi-resistant to antibiotics with 32 different phenotypes. Phenotypic resistance to ampicillin + tetracycline + bactrim was the most common type. All of ETEC strains examined harbored resistant genes of blaTEM and tet(A) and ETEC was still sensitive to ceftazidime, norfloxacin and colistin. This is the first research on the resistant genes of ETEC K88, K99, 987P strains causing piglet diarrhea in Vinh Long and Dong Thap provinces.

### TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện nhằm xác định các chủng, sự đề kháng và gene kháng kháng sinh của Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) trên heo con tiêu chảy tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp. Tỷ lệ heo con tiêu chảy do E. coli khá cao (26,49%). Kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm E. coli ở heo con theo mẹ (97,27%) cao hơn ở heo cai sữa (89,00%). Sự hiện diện của vi khuẩn E. coli ở nền chuồng chiếm tỷ lệ 67,85% cao hơn trong nước uống (3,57%). Sự phân bố giữa các chủng K88, K99, 987P có sự khác biệt và K88 là chủng phân lập phổ biến nhất trên heo con tiêu chảy (20,24%). Tỷ lệ phát hiện chủng K88 ở heo theo mẹ (23,36%) cao hơn ở heo cai sữa (16,47%). Trong 196 dương tính có 263 chủng mang kháng nguyên bám dính; Có 20,58% (121/588 khuẩn lạc) mang cả 2 đến 3 loại kháng nguyên như K88+K99 (6,46%), K99+987P (5,27%), K88+987P (6,12%) và K88+K99+987P (2,72%). ETEC đã đề kháng cao với ampicillin, tetracycline, và bactrim. Có đến 134/152 chủng có hiện tượng kháng cùng lúc với nhiều loại kháng sinh và có đến 32 kiểu ghép khác nhau. Kiểu đa kháng với ampicillin + tetracycline + bactrim là phổ biến nhất. Tất cả các chủng ETEC kiểm tra đều mang gene đề kháng, bla<sub>TEM</sub> và tet(A). ETEC nhạy cảm cao với ceftazidime, norfloxacin, và colistin. Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Vĩnh Long và Đồng Tháp về gene đề kháng kháng sinh của các chủng ETEC K88, K99, 987P gây tiêu chảy cho heo con.

## 1 GIỚI THIỆU

Bệnh tiêu chảy heo con luôn là mối quan tâm của các nhà chăn nuôi và bác sỹ thú y vì đây là nguyên nhân dẫn đến tỷ lệ bệnh và tỷ lệ chết cao. Có rất nhiều nguyên nhân gây ra bệnh như điều kiện môi trường, do vi khuẩn, virus, ký sinh trùng hay do chăm sóc nuôi dưỡng nên việc tìm ra chính xác nguyên nhân bệnh không phải là điều dễ dàng, trong số đó, tiêu chảy do vi khuẩn *Escherichia coli* là phổ biến.

*Escherichia coli* là vi khuẩn hội sinh chiếm ưu thế nhất trong hệ vi sinh vật đường ruột của động vật có vú nhưng chúng cũng có thể trở thành tác nhân gây bệnh khi gặp điều kiện thuận lợi, khi đó một số nhóm *E. coli* gây độc tăng sinh mạnh, trở thành nguyên nhân quan trọng gây tiêu chảy trên người và gia súc, đặc biệt là gia súc non, trong đó chủng Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88, K99 và 987P gây bệnh chủ yếu trên heo con (Ronald, 2003; Nagy and Fekete, 1999; Alexa *et al.*, 2001; Fairbrother *et al.*, 2012). Để phòng và trị bệnh cho heo con, phần lớn người chăn nuôi sử dụng nhiều loại kháng sinh trên thị trường với liều dùng vô chừng. Điều này dẫn đến tình trạng kháng thuốc của chủng vi khuẩn *E. coli*. Nghiên cứu của Deboy *et al.* (1980) cho biết điều trị bằng kháng sinh đối với ETEC đã tạo áp lực chọn lọc những chủng ETEC kháng thuốc. Vấn đề kháng kháng sinh đã được nghiên cứu từ lâu trên thế giới, tuy nhiên việc xác định bằng kỹ thuật sinh học phân tử chỉ mới được thực hiện và quan tâm trong những năm gần đây tại Việt Nam với những nghiên cứu ở miền Bắc, một số tỉnh ở miền Nam nhưng vẫn chưa có nghiên cứu tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm để xác định tỷ lệ đề kháng và định danh các chủng vi khuẩn ETEC K88, K99 và 987P gây tiêu chảy ở heo con tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp; đồng thời xác định tỷ lệ đề kháng, đa kháng kháng sinh và các gene đề kháng kháng sinh của các chủng ETEC gây tiêu chảy trên heo con tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Hai trăm mười mẫu phân heo con tiêu chảy (107 mẫu phân heo con tiêu chảy thu thập từ 54 con heo theo mẹ, 53 con heo sau cai sữa) từ 6 trại và 21 hộ gia đình chăn nuôi heo tại các huyện Vũng Liêm, Long Hồ, TP. Vĩnh Long thuộc tỉnh Vĩnh Long, (103 mẫu từ 56 con heo theo mẹ, 47 con heo sau cai sữa) tại 11 trại và 15 hộ gia đình thuộc các huyện Châu Thành, Lấp Vò của tỉnh Đồng Tháp. Mẫu nền chuồng và nước uống thu thập 1 mẫu cho mỗi cơ sở chăn nuôi heo khảo sát.

Các đĩa giấy kháng sinh dùng trong nghiên cứu gồm ampicillin, ceftazidime, bactrim, norfloxacin, tetracycline, colistin, gentamicin (công ty Nam Khoa sản xuất). Kháng huyết thanh chuẩn K88, K99 và 987P (Denka Seiken, Nhật). Kit PCR (Master mix) (Promega -Mỹ), Agarose 100g (Bioline-Canada). Các primers dùng xác định các gene kháng kháng sinh: *bla<sub>TEM</sub>*, *tet(A)*, *sulII*, *dhfrV* của hãng IDT, Mỹ. 16 chủng ETEC có kiểu hình đa kháng với ampicillin, tetracycline, sulfamethoxazole và trimethoprim dùng xác định sự hiện diện các gene kháng kháng sinh của các chủng ETEC.

### 2.2 phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Phương pháp phân lập, định danh vi khuẩn ETEC

Phương pháp phân lập được thực hiện theo TCVN 5155-90, định danh các chủng ETEC dựa theo Ørskov and Ørskov (1978) và kiểm tra tính đề kháng của ETEC với các loại kháng sinh dựa trên phương pháp khuếch tán trên thạch của Bauer *et al.* (1966).

#### 2.2.2 Phương pháp xác định gene kháng kháng sinh của các chủng ETEC gây tiêu chảy heo con

Tách chiết DNA vi khuẩn bằng phương pháp nhiệt tiến hành theo Costa *et al.* (2010). Các bước của phản ứng PCR thực hiện theo Joshi and Deshpande (2010).

**Bảng 1: Các cặp mồi xác định gene kháng kháng sinh của chủng ETEC sử dụng trong phản ứng PCR**

Gene kháng kháng sinh	Trình tự nucleotide của mồi (5'→3')	Độ dài (bp)	Nguồn tham khảo
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	GAGTATTCAACATTTTCGT ACCAATGCCTTAATCAGTGA	857	Maynard (2003)
<i>tetA</i>	GTGAAACCCACATACCCCC GAAGGCAAGCAGGATGTAG	888	Harel (1991)
<i>dhfrV</i>	CTGCAAAAGCGAAAAACGGAGC AATAGTTAATGTTTGAGCTAAAG	432	SkÖld (2001)
<i>sulII</i>	CGGCATCGTCAACATAACC GTGTGCGGATGAAGTCAG	722	Harel (1991)

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Kết quả khảo sát heo con bệnh tiêu chảy tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp

Kết quả khảo sát tỷ lệ heo con tiêu chảy tại địa bàn tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp cho thấy có 761/2.873 con bệnh chiếm tỷ lệ 26,49%, trong đó tỷ lệ heo con tiêu chảy ở Vĩnh Long (29,83%) cao hơn ở Đồng Tháp (23,03%) và sự khác biệt này rất có ý nghĩa thống kê ( $p=0,000$ ). Nguyên nhân của sự khác biệt này có thể do chăn nuôi heo ở tỉnh Vĩnh Long chủ yếu nhỏ lẻ dạng hộ gia đình nên điều kiện chăm sóc, nuôi dưỡng còn hạn chế. Ở tỉnh Đồng Tháp, chăn nuôi theo phương thức tập trung theo hình thức trang trại lớn, các trại này có cán bộ kỹ thuật riêng, có tay nghề, có kiến thức khoa học, có biện pháp phòng bệnh kịp thời, vì vậy tỷ lệ heo bệnh tiêu chảy thấp hơn. Kết quả khảo sát tỷ lệ tiêu chảy trên heo con trong nghiên cứu của chúng tôi (26,49%) tương đương với báo cáo của Lê Thị Hoài (2008) ở tỉnh Hưng Yên, heo con tiêu chảy chiếm 30,30%; Lê Văn Dương (2010), tỷ lệ mắc tiêu chảy trên heo con tại một số huyện của tỉnh Bắc Giang là 30,73%. DeWey *et al.* (1995) nhận định là những đàn heo mẹ được tiêm phòng vaccine sẽ giảm được khả năng mắc bệnh cho heo con. Tuy nhiên, trên thực tế khảo sát, hầu hết những trại chăn nuôi ở Vĩnh Long và Đồng Tháp ít quan tâm đến tiêm phòng bệnh tiêu chảy heo con do ETEC nên bệnh còn xảy ra thường xuyên chiếm tỷ lệ khá cao.

**Bảng 2: Tỷ lệ heo con bệnh tiêu chảy tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp**

Địa điểm	Số heo khảo sát	Số heo tiêu chảy	Tỷ lệ (%)
Vĩnh Long	1.458	435	29,83
Đồng Tháp	1.415	326	23,03
Tổng	2.873	761	26,49

#### 3.2 Kết quả phân lập vi khuẩn *E. coli* trên phân heo con tiêu chảy tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp

Tỷ lệ heo con tiêu chảy do ETEC ở tỉnh Đồng Tháp chiếm 92,23%, tỉnh Vĩnh Long chiếm 94,39%. Tỉnh Vĩnh Long có tỷ lệ heo con tiêu chảy do *E. coli* cao hơn địa bàn Đồng Tháp, tuy nhiên sự khác biệt này là không có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ) (Bảng 3). Vi khuẩn *E. coli* ký sinh thường xuyên trong ruột heo và chúng chiếm đến 80% vi khuẩn hiếu khí sống ở ruột (Ronald, 2003). Vi khuẩn này trở thành tác nhân gây bệnh khi sức đề kháng con vật yếu đi, do mắc bệnh truyền

nhiễm, hoặc do yếu tố môi trường ngoại cảnh bất lợi như lạnh, ẩm, mưa đột ngột, môi trường đường ruột thay đổi.

**Bảng 3: Kết quả phân lập vi khuẩn *E. coli* trên phân heo con tiêu chảy tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp**

Địa điểm	Số mẫu phân lập	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Đồng Tháp	103	95	92,23
Vĩnh Long	107	101	94,39
Tổng	210	196	93,33

Vai trò của vi khuẩn *E. coli* gây tiêu chảy heo con đã được Francis (1999) cho thấy vi khuẩn *E. coli* là nguyên nhân chính yếu gây bệnh và chết ở heo con. Bệnh thường gây ra bởi những chủng vi khuẩn *E. coli* sinh độc tố. Nguyễn Cảnh Dũng và Cù Hữu Phú (2011) nghiên cứu về vai trò gây bệnh của vi khuẩn *E. coli* trên heo con sau cai sữa tại Lâm Đồng cho biết tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *E. coli* là 74,71%. Trương Quang (2005) khi phân lập vi khuẩn *E. coli* từ các mẫu phân heo tiêu chảy tại Hà Nội cho biết có 100% mẫu phân heo tiêu chảy phân lập được *E. coli*. Nghiên cứu của Lý Thị Liên Khai (2001), tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *E. coli* phân lập từ heo con tiêu chảy tại thành phố Cần Thơ và Hồ Chí Minh là 84%.

Từ kết quả Bảng 3 đã thấy rõ vai trò phổ biến của vi khuẩn *E. coli* trong hội chứng tiêu chảy heo con, tỷ lệ phân lập vi khuẩn *E. coli* dao động từ 74,71% đến 100%.

#### 3.3 Kết quả phân lập vi khuẩn *E. coli* trong môi trường tại các cơ sở chăn nuôi heo tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp

Kết quả Bảng 4 cho thấy có 40/112 mẫu môi trường dương tính với *E. coli*, chiếm 35,71%. Trong đó, có 38/56 mẫu nền chuồng có sự hiện diện vi khuẩn *E. coli* chiếm 67,85%, tỷ lệ này cao hơn rất nhiều so với mẫu nước uống (3,57%) với  $p=0,000$ . Khi nền chuồng dính phân, heo con đi lại vận động, chúng sẽ đạp hoặc có thể nằm lên phân. Phân chân, làm lan truyền vi khuẩn gây bệnh trong đàn. Thêm vào đó, nước dội rửa chuồng được phun trực tiếp xuống nền chuồng ngay cả nơi heo con nằm do vậy độ ẩm trong chuồng thường cao. Chuồng ẩm ướt sẽ là điều kiện thuận lợi để vi sinh vật phát triển. Hơn nữa, việc sát trùng chuồng trại chưa được quan tâm nên mức độ nhiễm càng cao. Tỷ lệ phát hiện *E. coli* trong mẫu nước uống rất thấp (3,57%) có thể do nước sử dụng là nguồn nước sông hay giếng khoan có qua xử lý. Với kết

quả trên, có khả năng sự tồn tại của vi khuẩn *E. coli* trong nền chuồng cao là nguy cơ làm lây lan bệnh tiêu chảy heo con.

**Bảng 4: Kết quả phân lập vi khuẩn *E. coli* từ môi trường tại một số cơ sở chăn nuôi heo ở tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp**

Loại mẫu	Số mẫu phân lập	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Nền chuồng	56	38	67,85
Nước uống	56	2	3,57
Tổng	112	40	35,71

**3.4 Kết quả định danh các chủng *E. coli* K88, K99, 987P gây tiêu chảy heo con tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp**

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) là nguyên nhân chủ yếu gây tiêu chảy heo con theo mẹ và heo con cai sữa (Nagy and Fekete 1999, Alexa *et al.* 2001, Nietfeld and Yeary 2002 và Toledo *et al.* 2012). Chúng gây bệnh dựa trên 2 yếu tố là yếu tố độc lực và yếu tố bám dính. Debroy and Maddox (2001) cho biết yếu tố bám

dính K88, K99 và 987P được tìm thấy phổ biến ở những chủng ETEC gây tiêu chảy cho heo con. Kết quả Bảng 5 cho thấy trong 196 mẫu định danh có 263 chủng ETEC được xác định. Trong đó, có 119/263 chủng dương tính với K88 chiếm tỷ lệ 20,24%, kế đó là K99, 987P chiếm tỷ lệ lần lượt là 13,27% và 11,23% và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ( $p=0,000$ ). Điều này cho thấy K88 là chủng phổ biến nhất gây tiêu chảy cho heo con tại hai tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp. Kết quả trên có sự tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Trang và *ctv.* (2011) cho biết chủng *E. coli* K88 chiếm tỷ lệ cao nhất (40%), kế đó là chủng K99 (12,30%) và 987P (3,08%) khi kiểm tra 65/136 mẫu phân heo tiêu chảy tại Trà Vinh. Năm 2009, Vidotto *et al.* phân lập trên 100 mẫu heo con tiêu chảy từ 4 trang trại vùng Londrina, Parana State, miền Nam Brazil cho thấy chủng K88 chiếm tỷ lệ 44% cao hơn so với chủng K99 (30%) và 987P (25%). Wang *et al.* (2006) đã thu thập 179 mẫu phân heo con tiêu chảy tại Hubei, Trung Quốc cho thấy chủng *E. coli* K88 chiếm ưu thế là 20,10%, trong khi K99 là 1,10% và 987P là 6,10%.

**Bảng 5: Kết quả định danh các chủng *E. coli* K88, K99, 987P gây tiêu chảy heo con tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp**

Địa điểm	SM phân tích (SKL ĐD)	K88		K99		987P		Tổng	
		Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
Vĩnh Long	101 (303)	57	18,81	35	11,55	27	8,91	119	39,27
Đồng Tháp	95 (285)	62	21,75	43	15,09	39	13,68	144	50,52
			( $P=0,375$ )		( $P=0,206$ )		( $P=0,067$ )		( $P=0,000$ )
Tổng	196 (588)	119	20,24 <sup>a</sup>	78	13,27 <sup>b</sup>	66	11,23 <sup>b</sup>	263	44,73

SM: số mẫu, SKLĐD: số khuẩn lạc định danh. Các giá trị của các chữ số mũ trong cùng một hàng khác nhau là khác nhau rất có ý nghĩa thống kê,  $p=0,000$

**3.5 Sự phân bố các chủng *E. coli* K88, K99, 987P ở tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp theo lứa tuổi**

Kết quả Bảng 6 cho thấy sự phân bố 2 chủng K99 và 987P trên heo con theo mẹ và heo con sau cai sữa không có sự khác biệt ( $p>0,05$ ). Tuy nhiên,

tỷ lệ phát hiện chủng K88 ở heo theo mẹ (23,36%) cao hơn ở heo con cai sữa (16,47%) với  $p<0,05$ . Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Wilson and Francis (1986) khi nhận định rằng K88 là chủng phổ biến nhất gây tiêu chảy, đặc biệt ở heo sơ sinh.

**Bảng 6: Sự phân bố các chủng *E. coli* K88, K99, 987P ở tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp theo lứa tuổi**

Lứa tuổi	SM phân tích (SKL ĐD)	K88		K99		987P		Tổng	
		Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
Heo theo mẹ	107 (321)	75	23,36	46	14,33	41	12,77	162	50,46
Heo cai sữa	89 (267)	44	16,47	32	11,98	25	9,36	101	37,82
			( $P=0,005$ )		( $P=0,158$ )		( $P=0,068$ )		
Tổng	196 (588)	119	20,24	78	13,27	66	11,23	263	44,73

SM: số mẫu, SKLĐD: số khuẩn lạc định danh

**3.6 Tỷ lệ mang kháng nguyên ghép của các chủng ETEC gây tiêu chảy heo con**

Trong 588 khuẩn lạc kiểm tra có 121 chủng hiện diện đồng thời từ 2 đến 3 loại kháng nguyên. Trong đó, 38/121 mang kháng nguyên ghép K88 và K99 chiếm tỷ lệ 6,46%, tiếp đến là K88+987P

có 36/121 chủng (6,12%), K99+987P có 31/121 chủng (5,27%), có 16/121 chủng có cả 3 loại K88+K99+987P (2,72%). Sự hiện diện đồng thời của các chủng này trên heo bệnh góp phần làm cho bệnh nhiễm trùng đường ruột do ETEC thêm phức tạp, giống như nhận định của Garabal (1997).

**Bảng 7: Tỷ lệ nhiễm ghép các chủng ETEC gây tiêu chảy heo con ở hai tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp**

Số kháng nguyên ghép	Kiểu ghép	Số khuẩn lạc kiểm tra	Số khuẩn lạc nhiễm ghép	Tỷ lệ (%)
2	K88+K99	588	38	6,46
	K88+987P	588	36	6,12
	K99+987P	588	31	5,27
3	K88+K99+987P	588	16	2,72

**3.7 Tỷ lệ các chủng ETEC đề kháng với kháng sinh khảo sát trên heo con tiêu chảy ở tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp**

Kết quả phân tích cho chúng tôi thấy rằng các chủng *E. coli* phân lập được trên heo con tiêu chảy tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp đã có sự đề kháng cao đối với ampicillin theo tỷ lệ lần lượt là 89,61% và 93,33%, đề kháng trung bình đối với tetracycline với tỷ lệ 59,37% và 66,67%. Bactrim là kháng sinh đã bị đề kháng cao đối với các chủng ETEC phân lập ở tỉnh Đồng Tháp (98,66%) nhưng lại chỉ ở mức vừa (71,43%) đối với tỉnh Vĩnh Long. Tuy nhiên, ceftazidime là kháng sinh mà ETEC tại hai tỉnh khảo sát vẫn còn nhạy cảm cao, tỷ lệ ghi nhận ở tỉnh Vĩnh Long là 90,90%, ở tỉnh Đồng Tháp là 98,66%, tương tự norfloxacin còn được nhạy cảm cao (90,58%) đối với các chủng ETEC ở tỉnh Đồng Tháp nhưng chỉ được nhạy ở mức vừa (76,62%) với ETEC ở tỉnh Vĩnh Long.

Đối với colistin, ETEC tại tỉnh Vĩnh Long nhạy cảm cao (83,12%) nhưng tại tỉnh Đồng Tháp lại nhạy trung bình (62,66%). Từ kết quả thu được, chúng tôi nhận thấy rằng các chủng ETEC trong nghiên cứu này đã có sự đề kháng tương tự nghiên cứu của Đỗ Ngọc Thúy và ctv. (2002) kiểm tra 106 chủng *E. coli* tại một số tỉnh miền Bắc cho biết vi khuẩn *E. coli* đã đề kháng với tetracycline, bactrim theo tỷ lệ lần lượt là 97,17% và 80,19%. Lê Văn Dương (2010) cũng cho thấy các chủng *E. coli* phân lập được từ heo con tiêu chảy ở Bắc Giang có khả năng đề kháng mạnh đối với các kháng sinh phổ biến như tetracycline, bactrim, ampicillin với tỷ lệ lần lượt là 100%, 91,11%, 92,22%. Võ Thành Thìn (2011) đã phân tích 184 chủng vi khuẩn *E. coli* tại một số tỉnh miền Nam Trung Bộ và Tây Nguyên cho thấy vi khuẩn đã đề kháng cao với tetracycline, colistin, bactrim, ampicillin theo tỷ lệ lần lượt là 94,57%, 85,33%, 73,91% và 71,2%.

**Bảng 8: Tỷ lệ các chủng ETEC đề kháng với kháng sinh khảo sát trên heo con tiêu chảy ở tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp**

Loại kháng sinh	Tỉnh Vĩnh Long (n=77)		Tỉnh Đồng Tháp (n=75)	
	% Kháng	% Nhạy	% Kháng	% Nhạy
Ampicillin	89,61	10,38	93,33	6,67
Ceftazidime	9,09	90,90	1,34	98,66
Colistin	16,88	83,12	37,34	62,66
Gentamicin	51,95	48,05	36,00	64,00
Tetracycline	59,37	39,58	66,67	33,33
Bactrim	71,43	28,57	98,66	1,34
Norfloxacin	23,38	76,62	15,29	90,58

Theo các tác giả Fairbrother *et al.* (2006) khi nghiên cứu về tính kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh (trong đó có *E. coli*) đã nhận định rằng sự xuất hiện của những chủng đề kháng kháng sinh là một vấn đề gây ra bởi nhiều yếu tố: đây có thể là do việc sử dụng kháng sinh không hợp lý trong điều trị hoặc dùng bổ sung vào thức ăn chăn nuôi. Từ kết quả trên, kháng sinh ceftazidime, norfloxacin,

colistin có thể được khuyến cáo trong điều trị cho heo con bệnh tiêu chảy.

**3.8 Các kiểu đa kháng với kháng sinh của chủng ETEC phân lập được từ heo con tiêu chảy tại tỉnh Vĩnh Long và tỉnh Đồng Tháp**

Trong 134 chủng, có 36 chủng với 6 kiểu ghép khác nhau đề kháng với 2 loại kháng sinh, 36 chủng với 11 kiểu ghép khác nhau đa kháng với 3

loại kháng sinh, 37 chủng đa kháng với 4 loại kháng sinh với 8 kiểu ghép, đa kháng với 5 loại kháng sinh có 17 chủng với 5 kiểu ghép, đa kháng với 6 loại kháng sinh có 6 chủng chỉ với 1 kiểu ghép và 2 chủng đa kháng hoàn toàn với 7 loại kháng sinh với 1 kiểu ghép. Trong đó, số chủng đa kháng phổ biến nhất từ 2 đến 4 loại kháng sinh. Có 27/36 chủng mang kiểu hình đa kháng với ampicillin + bactrim chiếm tỷ lệ 75,00%. Kiểu hình đa kháng ampicillin + bactrim + tetracycline hiện hiện phổ biến trong những chủng *E. coli* phân lập. Điều này cho thấy sự đa dạng về kiểu hình đa kháng từ các chủng ETEC trên heo con tiêu chảy

rất đáng quan tâm. Sự khác nhau về mức độ đa kháng thuốc và kiểu hình đa kháng đã phản ánh tình trạng sử dụng kháng sinh tại các trại. Tương tự, kết quả nghiên cứu của Đỗ Ngọc Thúy và ctv. (2002) tại miền Bắc về tính kháng kháng sinh của 106 chủng *E. coli* phân lập có đến 96 chủng (90,57%) đa kháng thuốc và đa kháng phổ biến từ 3 loại kháng sinh trở lên. Maynard *et al.* (2003) đã cho thấy trong 23 năm (1978-2000) tại Quebec-Canada tỷ lệ các chủng ETEC từ heo con tiêu chảy đa kháng với 8 loại kháng sinh, trong đó có ampicillin, tetracycline, bactrim tăng dần theo thời gian.

**Bảng 9: Các kiểu đa kháng với kháng sinh các chủng ETEC phân lập được từ heo con tiêu chảy tại tỉnh Vĩnh Long và tỉnh Đồng Tháp**

Số kháng sinh đa kháng	Kiểu hình kháng	Số kiểu ghép	Số chủng kháng/ 134 chủng kiểm tra	Tỷ lệ (%)
2	Am+Bt	6	27	20,14
	Am+Te		2	1,49
	Am+Nr		2	1,49
	Te+Bt		2	1,49
	Te+Co		1	0,75
	Bt+Cz		2	1,49
			36	26,85
3	Am+Bt+Te	11	13	9,70
	Am+Bt+Ge		12	8,95
	Am+Bt+Nr		3	2,24
	Am+Nr+Co		1	0,75
	Am+Co+Ge		1	0,75
	Am+Co+Bt		1	0,75
	Cz+Ge+Bt		1	0,75
	Co+Te+Bt		1	0,75
	Co+Ge+Te		1	0,75
	Co+Ge+Bt		1	0,75
	Cz+Nr+Bt		1	0,75
			36	26,89
4	Am+Te+Bt+Nr	8	3	2,24
	Am+Te+Bt+Ge		9	6,71
	Am+Te+Bt+Co		11	8,21
	Am+Ge+Bt+Co		4	2,98
	Am+Ge+Bt+Nr		5	3,72
	Am+Co+Bt+Cz		1	0,75
	Am+Nr+Bt+Cz		1	0,75
	Am+Ge+Te+Co		3	2,24
			37	27,60
5	Am+Ge+Te+Bt+Nr	5	11	8,21
	Am+Ge+Te+Bt+Co		3	2,24
	Am+Ge+Te+Co+Nr		1	0,75
	Am+Ge+Bt+Co+Nr		1	0,75
	Am+Ge+Bt+Cz+Nr		1	0,75
			17	12,70
6	Am+Ge+Te+Bt+Co+Nr	1	6	4,47
7	Am+Ge+Te+Bt+Co+Nr+Cz	1	2	1,49

Am: Ampicillin, Ge:Gentamicin; Te: tetracyclin; Bt: Bactrim; Nr: norfolxacin; Co: colistin; Cz: ceftazidime

**3.9 Kết quả xác định các gene kháng kháng sinh của chủng ETEC phân lập từ heo con tiêu chảy tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp**

Các chủng ETEC kiểm tra đều phát hiện có các gene đề kháng kháng sinh, trong đó, *bla<sub>TEM</sub>* là gene đề kháng hiện diện trong tất cả các chủng *E. coli* kiểm tra có kiểu hình kháng ampicillin (Hình 1). Sự đề kháng xảy ra do vi khuẩn tự tiết enzyme  $\beta$ -lactamase sẽ thủy phân vòng  $\beta$ -lactam làm mất tính diệt khuẩn của kháng sinh. Nhận định này cũng phù hợp với nhận định của Boerlin *et al.* (2005); Võ Thành Thìn (2011). Tương tự, nghiên cứu tại Canada của Hamelin *et al.* (2007) cho biết *bla<sub>TEM</sub>* là gene hiện diện phổ biến. Điều này cho thấy sự tương đồng giữa kiểu gene và kiểu hình về khả năng kháng kháng sinh của chủng ETEC đối với kháng sinh ampicillin.

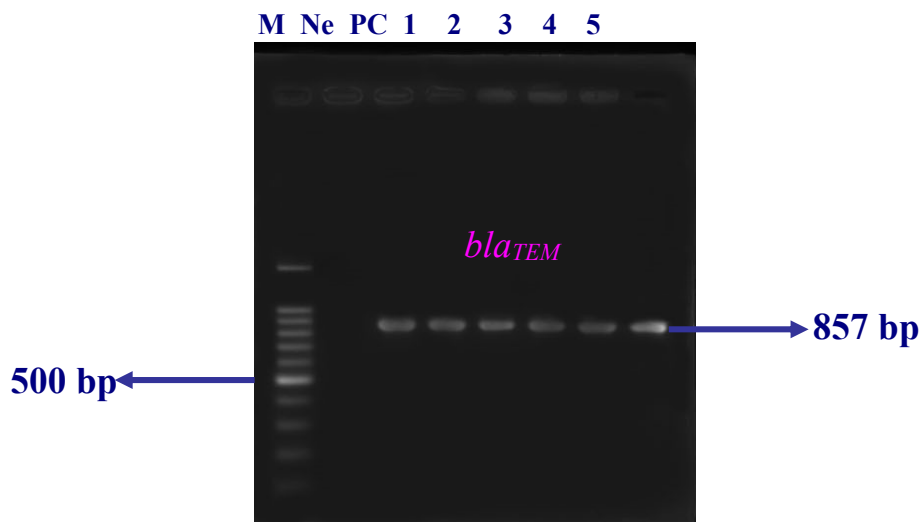
**Bảng 10: Tỷ lệ các chủng *E. coli* phân lập được từ heo con tiêu chảy một số gene kháng kháng sinh của tỉnh Vĩnh Long và tỉnh Đồng Tháp**

Gene đề kháng	Số chủng kiểm tra (n=16)	
	Số chủng dương tính	%
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	16	100,00
<i>tet(A)</i>	16	100,00
<i>sulII</i>	12	75,00
<i>dhfrV</i>	14	87,50

Trong 16 chủng ETEC kiểm tra, gene *tet(A)* đề kháng với tetracycline được tìm thấy ở 16/16 chủng (100%) (hình 2). Kết quả nghiên cứu của

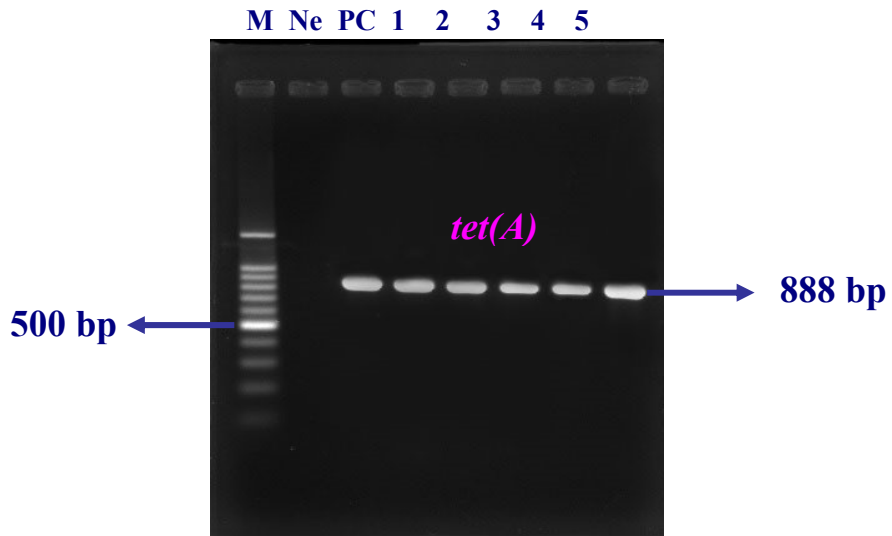
chúng tôi tương tự với nghiên cứu của Võ Thành Thìn (2011) cho thấy các chủng *E. coli* phân lập có mang gene *tet(A)* với tỷ lệ 84,24%. Tuy nhiên, Maynard *et al.* (2003) nghiên cứu về gene đề kháng kháng sinh trên chủng ETEC tại Quebec-Canda nhận thấy *tet(A)* hiện diện ở 26/104 chủng phân lập có đề kháng với tetracycline nhưng với tỷ lệ thấp (25%).

Trimethoprim (TMP) đơn hay kết hợp với sulfamethoxazole (SUL) là một kháng khuẩn hiệu quả và ít tốn kém. Gene *sulII* mã hóa cho yếu tố kháng đối với, sulfamethoxazole hiện diện 12/16 chủng *E. coli* kiểm tra chiếm tỷ lệ 75,00% (Hình 3), gene *dhfrV* mã hóa cho yếu tố kháng đối với trimethoprim được tìm thấy trên 14 chủng dương tính (87,50%) (hình 4). Nghiên cứu của Maynard *et al.* (2003) cho biết trong 23 năm khảo sát (1978-2000) về gene kháng kháng sinh trên ETEC tại Canada thì gene *sulII* và gene *dhfrV* có sự tăng vọt trong 5 năm cuối với tỷ lệ lần lượt là 47% và 36%. Nghiên cứu của Maynard *et al.* (2003) cho biết chủng ETEC khảo sát có sự gia tăng đề kháng do việc thu nhận gene đề kháng. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sự tương đồng giữa kiểu gene và kiểu hình kháng kháng sinh. Trong 16 chủng *E. coli* kiểm tra, hầu hết các chủng đều mang ít nhất 2 kiểu gene đề kháng.. Chính vì vậy, người chăn nuôi cần cẩn thận trong việc sử dụng kháng sinh nhằm tránh sự xuất hiện hiện tượng đề kháng dẫn đến hiện diện gene kháng thuốc trong quần thể vi khuẩn gây ảnh hưởng lớn trong cả cộng đồng.



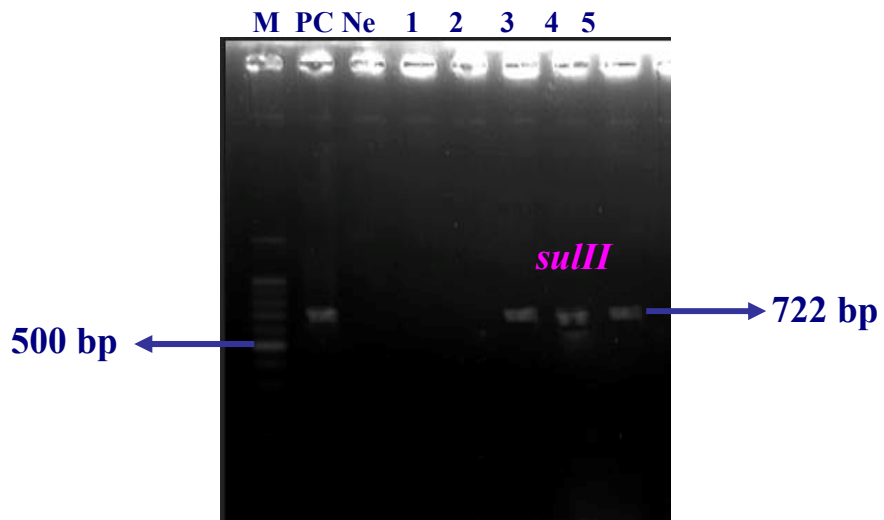
**Hình 1: Sản phẩm PCR của gene *bla<sub>TEM</sub>* sau quá trình điện di**

M: DNA marker. Ne: đối chứng âm *bla<sub>TEM</sub>*, PC: đối chứng dương *bla<sub>TEM</sub>* *bla<sub>TEM</sub>*(+); giếng 1,4,5 (chủng K88); Giếng 2 (chủng K99); Giếng 3 (chủng 987P)



**Hình 2: Sản phẩm PCR của gene *tet(A)* sau quá trình điện di**

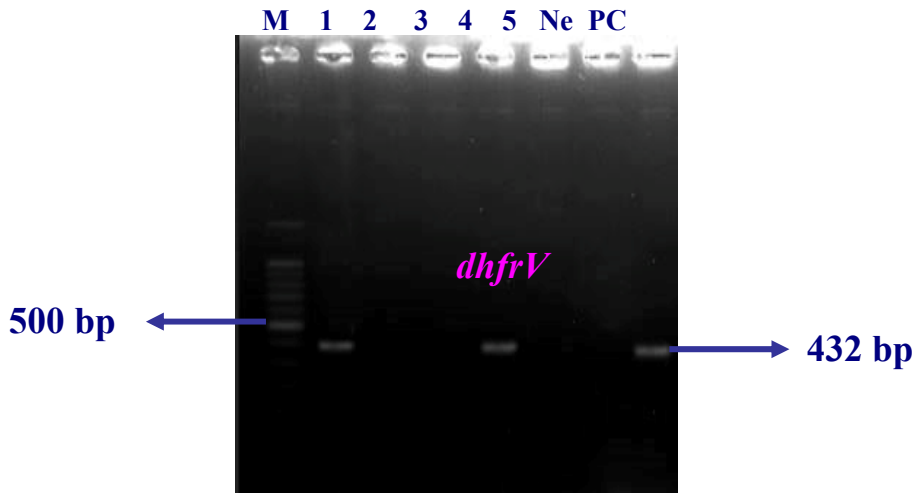
*M*: DNA marker. *Ne*: đối chứng âm *tet(A)*, *PC*: đối chứng dương *tet(A)* *tet(A)* (+): giếng 1,3 (chủng K88); Giếng 2 (chủng 987P); Giếng 4,5 (chủng K99)



**Hình 3: Sản phẩm PCR của gene *sulII* sau quá trình điện di**

*M*: DNA marker, *Ne*: đối chứng âm *sulII*, *PC*: đối chứng dương *sulII*  
*sulII* (-): giếng 1 (chủng K88) và giếng 2 (chủng 987P), *sulII* (+): giếng 3,4 (chủng K88) và giếng 5 (chủng K99)





**Hình 4: Sản phẩm PCR của gene *dhfrV* sau quá trình điện di**

*M*: DNA marker, *Ne*: đối chứng âm *dhfrV*, *PC*: đối chứng dương *dhfrV*

*dhfrV* (+): giếng 1 (chủng K88) và giếng 4 (chủng 987P), *dhfrV* (-): giếng 2,3 (chủng K88) và giếng 5 (chủng K99)

#### 4 KẾT LUẬN

Tỷ lệ heo con bệnh tiêu chảy tại tỉnh Vĩnh Long và Đồng Tháp là khá cao (26,49%). Tỷ lệ phát hiện *E. coli* ở heo con tiêu chảy rất cao chiếm tỷ lệ 93,33%, trong đó ở heo con theo mẹ tiêu chảy (97,27%) chiếm tỷ lệ cao hơn heo con sau cai sữa (89,00%).

Nền chuồng có khả năng làm lây lan bệnh tiêu chảy heo con. Tỷ lệ nhiễm *E. coli* từ mẫu nền chuồng (67,85%) cao hơn từ nước uống (3,57%).

Các chủng ETEC K88, K99 và 987P, trong đó K88 là chủng phổ biến nhất (20,24%) là các chủng gây tiêu chảy cho heo con. Chủng K88 phân bố ở heo theo mẹ (23,36%) cao hơn heo con sau cai sữa (16,47%). Ba chủng này nhiễm ghép từ 2 đến 3 chủng rất đa dạng và phức tạp.

Các chủng ETEC đã đề kháng cao với ampicillin, Bactrim, đề kháng trung bình với tetracycline và hầu hết chúng đã đề kháng từ 2-7 loại kháng sinh khảo sát, trong đó, 134/152 chủng ETEC đa kháng với 32 kiểu đa kháng khác nhau. Kiểu hình đa kháng (ampicillin+bactrim+tetracycline) là phổ biến.

Hầu hết các chủng đều hiện diện gen kháng thuốc, *bla<sub>TEM</sub>* và *tet(A)* là hai gen có tỷ lệ rất cao 100%.

Norfloxacin, ceftazidime và colistin là ba kháng sinh vẫn còn hiệu quả đối với các chủng tại hai tỉnh khảo sát.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alexa P., Stouracova K., Hamrik J. and Rychilik I, 2001. Gene typing of the colonisation factors K88 (F4) in enterotoxigenic Escherichia coli strains isolated from diarrhoeic piglets. Vet Med.-Czech, 46(2): 46-49.
2. Bauer AW., Kirby WMM., Sherris JC, Turck M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, 45: 493-496.
3. Boerlin P., R. Travis, C. L. Glyes, R. Reid-Smith, N. Janecko, H. Lim, V. Nicholson, S. A. McEwen, R. Friendship and M. Archambault. 2005. Antimicrobial resistance and virulence genes of Escherichia coli isolates from swine in Ontario. Appl., Environ. Microbiol. 71 (11):6753-6761
4. Costa MM., Drescher G., Maboni F., Weber SS., Schrank A., Vainstein MH., Schrank IS and Vargas AC., 2010. Virulence factors, antimicrobial resistance, and plasmid content of Escherichia coli isolated in swine commercial farms. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 62(1): 30-36.
5. Deboy JM., Wachsmuth IK and Davis BH., 1980. Antibiotic resistance in Enterotoxigenic and Non-Enterotoxigenic Escherichia coli.

- Journal of clinical microbiology, 12(2): 264-270.
6. Debroy C. and Maddox CW., 2001. Identification of virulence attributes of gastrointestinal Escherichia coli isolates of veterinary significance. *Animal health 7Res review*, 2: 129-140.
  7. Dewey CE., Wittum TE., Scott Hurd H, Dargatz DA. and Hill GW., 1995. Herd-and litter-level factors associated with the incidence of diarrhea morbidity and mortality in piglets 4-14 days of age. *Swine Health and Production*, 3(3): 105- 112.
  8. Đào Trọng Đạt và Phan Thanh Phương, 1986. Bệnh gia súc non. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
  9. Đỗ Ngọc Thúy, Darren Trott, Alan Frost, Kirsty Townsend, Cù Hữu Phú, Nguyễn Ngọc Nhiên, Âu Xuân Tuấn, Nguyễn Xuân Huyền, Văn Thị Hương và Vũ Ngọc Quý, 2002. Tính kháng kháng sinh của chủng Escherichia coli phân lập từ lợn con tiêu chảy ở một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*, 9(2).
  10. Fairbrother JM. and Gyles CL., 2006. Diseases of swine. 9th edition. Oxford. 1153 pp.
  11. Fairbrother JM. and Gyles CL., 2012. Diseases of swine. 10th edition. Oxford. 983 pp.
  12. Francis DH., 1999. Colibacillosis in pigs and its diagnosis. *Swine Health Prod.*; 7 (5):241-244.13. Hamelin K., Bruant G., El-Shaarawi A., Hill S., Edge TA., Fairbrother J., Harel J., Maynard C., Masson L. and Brousseau R., 2007. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in Escherichia coli isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. *Applied and Environment microbiology*, 73(2): 477-484.
  13. Harel, J., H. Lapointe, A. Fallara, L. A. Lortie, M. Bigras-Poulin, S. Lariviere, and J. M. Fairbrother. 1991. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with Escherichia coli serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 29:745–752.15. Joshi M. and Deshpande JD., 2010. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International journal of biomedical research*, 1(5): 81-97.
  14. Lê Thị Hoài, 2008. Xác định vai trò gây bệnh của vi khuẩn E. coli, C. perfringens trong hội chứng tiêu chảy ở lợn từ sơ sinh đến 60 ngày tuổi tại tỉnh Hưng Yên và thử nghiệm phác đồ điều trị. Luận văn thạc sĩ khoa học nông nghiệp. Trường Đại học Thái Nguyên.
  15. Lê Văn Dương, 2010. Phân lập, xác định vai trò gây bệnh của Escherichia coli trong hội chứng tiêu chảy ở lợn con tại một số huyện của tỉnh Bắc Giang và biện pháp phòng trị. Luận văn thạc sĩ khoa học nông nghiệp. Trường Đại học Thái Nguyên.
  16. Maynard C., John M. Fairbrother, Sadjia Bekal, Francois Sanschagrín, Roger C. Levesque, Roland Brousseau, Luke Masson, Serge Lariviere and Jose'e Harel. 2003. Antimicrobial Resistance Genes in Enterotoxigenic Escherichia coli O149:K91 Isolates Obtained over a 23-Year Period from Pigs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 47 (10): 3214-3221.
  17. Maynard C., Fairbrother JM., Bekal S., Sanschagrín F., Roger CL., Brousseau R., Masson L., Lariviere S. and Harel J., 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic Escherichia coli O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(10): 3214–3221.
  18. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals, 1999. *Vet Res.*, 30: 259-284.
  19. Nietfeld JC. and Yeary T., 2002. Pilus genes in Escherichia coli isolated from pigs with diarrhea.
  20. Nguyễn Cảnh Dũng và Cù Hữu Phú, 2011. Xác định vai trò gây bệnh của E. coli, Salmonella trong hội chứng tiêu chảy ở lợn sau cai sữa tại một số địa phương tỉnh Lâm Đồng. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*, 18(1):56-64.
  21. Nguyễn Thị Minh Trang và ctv., 2011. Tình hình nhiễm và sự nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn E. coli gây bệnh tiêu chảy trên heo con từ 1-60 ngày tuổi tại tỉnh Trà Vinh.
  22. Ørskov and Ørskov, 1978. Methods in microbiology.
  23. Ronald A., 2003. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens .
  24. Skold, O. 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet. Res.*32:261–273.27.

- Tiêu chuẩn Việt Nam, 1990. TCVN 5155-1990. Thịt và sản phẩm của thịt. Phương pháp phát hiện và đếm số *Escherichia coli*.
25. Toledo A., Gómez D., Cruz C., Carréon R, López J., Giono S. and Castro AM, 2012. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in the suckling and weaning period in Mexico. *Journal of Medical Microbiology*, 61, 148-156.
26. Trương Quang, 2005. Kết quả nghiên cứu vai trò gây bệnh của *E. coli* trong hội chứng tiêu chảy ở lợn 1-60 ngày tuổi. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*, 12.
27. Vidotto C. Marilda, Lima C.S. Natália, Fritzen T.T. Juliana, Freitas C. Júlio, Venâncio J. merson, Ono A. Mario, 2009. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 199-204.
28. Võ Thành Thìn, 2011. Nghiên cứu xác định một số yếu tố độc lực của vi khuẩn *Escherichia coli* gây bệnh tiêu chảy ở lợn con tại khu vực Nam Trung Bộ và Tây Nguyên.
29. Võ Thành Thìn, Lưu Thị Nguyệt Minh, Lê Đình Hải, Nguyễn Ngọc Nhiên và Vũ Khắc Hùng, 2011. Phân tích một số gen kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ lợn con mắc bệnh tiêu chảy. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật thú y*, 18(3) : 24-30.
30. Wang J., Jiang S. W., Chen X. H., Liu Z. L. and Peng J., 2006. Prevalence of Fimbrial Antigen (K88 variants, K99 and 987P) of Enterotoxigenic *Escherichia Coli* from Neonatal and Post-weaning Piglets with Diarrhea in Central China.
31. Wilson RA. and Francis DH., 1986. Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. *American journal of veterinary. Res*, 2: 213-217.