

SỰ PHÂN BỐ CÁC GENE ĐỘC LỰC CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* PHÂN LẬP TỪ HEO CON BỆNH TIÊU CHẢY Ở MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG, VIỆT NAM

Nguyễn Thị Hạnh Chi¹, Lý Thị Liên Khai² và Hà Thanh Toàn³

¹ Khoa Nông nghiệp & Tài nguyên Thiên nhiên, Trường Đại học An Giang

² Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

³ Viện Nghiên cứu & Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 08/04/2014

Ngày chấp nhận: 28/08/2014

Title:

Distribution of virulent genes of Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains from diarrheal piglets in the Mekong Delta, Vietnam

Từ khóa:

Độc tố ruột, ETEC, heo con tiêu chảy, PCR, yếu tố bám dính

Keywords:

Diarrheic piglet, enterotoxin, ETEC, fimbriae, PCR

ABSTRACT

Ninety isolates of ETEC (49 isolates from lactating piglets and 41 isolates from weaned piglets) in several provinces in Mekong Delta were collected for virulent gene identification by polymerase chain reaction (PCR). The prevalence of fimbrial genotypes in examined ETEC strains were as follow: F4 (15.56%), F5 (8.89%), F6 (5.56%), F18 (17.78%) and F41 (0%). In detail, the percentage of ETEC strains carrying F4 and F8 adhesin genes in suckling piglets were highest at 16.33% and 12.2% respectively, followed by F5 (6.12%), F6 (8.16%); whereas in the weaned piglets, F18 gene was found in ETEC strains with the highest rate (22.45%), followed by F4, F5 and F6 at 14.63%, 12.2% and 2.44% respectively. On the other hands, this study found out the rate of STa (15.56%) and LT (12.22%) which were lower than STb (33.33%) and EAST1 (27.78%); Among them the distribution of strains of ETEC STa, STb, LT and EAST1 did not depend on the age. In the suckling piglets with diarrhea, positive strains with STb and EAST1 were the highest (33.33%) and (27.78%), while STa and LT gene in each strains were detected at 14.29 and 10.2% respectively. The rate for enterotoxins detected from weaned piglets was not significantly different with STa (17.07%), STb (26.83%), LT (14.63%), EAST1 (24.39%). This study indicated that the fimbriae F18 and toxic EAST1 played an important role on the possible pathogen factors causing the diarrhea in piglets; however, they have not been used in vaccines against diarrhea in some provinces of the Mekong Delta.

TÓM TẮT

Chín mươi chủng ETEC (49 chủng từ heo con theo mẹ và 41 chủng từ heo con sau cai sữa), từ phân heo con tiêu chảy tại một số tỉnh thành thuộc Đồng bằng sông Cửu Long được thu thập để xác định gene mang độc lực gây bệnh bằng kỹ thuật PCR. Sự lưu hành các chủng mang kháng nguyên bám dính ở ĐBSCL như sau: F4 (15,56%), F5 (8,89%), F6 (5,56%), F18 (17,78%) và F41 (0%); trong đó ở nhóm heo con theo mẹ F4 (16,33%) và F18 (12,2%) được tìm thấy nhiều nhất, kế đến là F5 (6,12%) và F6 (8,16%); ở nhóm heo sau cai sữa, chủng mang gene F18 là cao nhất (22,45%), tiếp theo là F4, F5, F6 với tỷ lệ lần lượt là 14,63%; 12,2%; 2,44%. Bên cạnh đó, nghiên cứu này cũng phát hiện gene mã hóa độc tố STb (33,33%) và EAST1 (27,78%) chiếm tỷ lệ cao nhất, kế đến là STa (15,56%) và LT (12,22%); trong đó, ở heo con theo mẹ tỷ lệ các chủng mang gene mã hóa độc tố STb (38,78%) và EAST1 (30,61%) cao nhất, STa và LT tương ứng là 14,29% và 10,2%; tỷ lệ này ở nhóm heo sau cai sữa tương đương nhau, STa (17,07%), STb (26,83%), LT (14,63%), EAST1 (24,39%). F18 và EAST1 đóng vai trò gây bệnh rất quan trọng, nhưng lại khiếm khuyết trong các loại vaccine phòng bệnh *E. coli* đã và đang sử dụng ở các tỉnh này.

1 GIỚI THIỆU

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) là một trong những nguyên nhân chính gây bệnh tiêu chảy ở heo con theo mẹ và sau cai sữa, gây thiệt hại đáng kể cho nền kinh tế các nước trên thế giới (Nagy and Fekete, 1999). Phần lớn các chủng vi khuẩn *E. coli* thuộc nhóm ETEC được phân lập từ heo tiêu chảy có khả năng sản sinh một hoặc nhiều yếu tố bám dính bám vào thụ thể trên bề mặt biểu mô ruột như F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F17, F18 và F41; và một hay nhiều độc tố ruột (enterotoxin), bao gồm độc tố chịu nhiệt (STa, STb, EAST1) và độc tố không chịu nhiệt (LT) (Gyles and Faibrother, 2010). Kết quả nghiên cứu trên thế giới cho thấy các chủng vi khuẩn ETEC gây bệnh tiêu chảy ở heo con thường xuyên mang yếu tố bám dính F4 và F18 và sản sinh hai loại độc tố phổ biến là STb và EAST1 ở nhiều nước như Cộng hòa Slovak (Hung *et al.*, 2007); Mỹ (Zhang *et al.*, 2007); Bra-xin (Costa *et al.*, 2010) và Cu Ba (Blanco *et al.*, 2006). Tương tự, các nghiên cứu ở miền Bắc, Nam Trung Bộ và Tây Nguyên Việt Nam cũng thường xuyên phát hiện được yếu tố bám dính F4, F18 và độc tố STb (Nguyen Thi Lan *et al.*, 2007; Do T.N. *et al.*, 2006; Võ Thành Thìn, 2012). Riêng ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) có một số tác giả đã tiến hành khảo sát các chủng gây bệnh tiêu chảy của *E. coli* (Nguyễn Khả Ngự và Lê Văn Tạo, 1996; Lý Thị Liên Khai và *ctv.*, 2003; Bùi Trung Trực và *ctv.*, 2004); tuy nhiên, phần lớn những nghiên cứu này chỉ dừng ở việc thực hiện phản ứng huyết thanh học để phát hiện kháng nguyên O và kháng nguyên F, hoặc giới hạn ở một số loại độc tố. Thật vậy, ở ĐBSCL có rất ít những thông tin về bệnh học, serogroups, serotypes và độc lực của ETEC gây bệnh trên heo. Hơn nữa, phần lớn các trại chăn nuôi tập trung và chăn nuôi gia đình ở một số tỉnh ở ĐBSCL đã tăng cường các biện pháp vệ sinh phòng bệnh và tiêm phòng vaccine, nhưng bệnh vẫn xảy ra với tỷ lệ rất cao. Vì vậy, việc kiểm tra thành phần chủng ETEC gây bệnh tiêu chảy trên heo con để phát hiện đầy đủ các yếu tố bám dính và các độc tố ruột là rất cần thiết nhằm khống chế bệnh (Fairbother *et al.*, 1992).

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu:

Từ 10/2012 đến 7/2013, 90 chủng vi khuẩn *E.*

coli (49 chủng được phân lập từ phân heo con theo mẹ và 41 chủng được phân lập từ phân heo sau cai sữa) thu thập từ 4 tỉnh/ thành thuộc ĐBSCL (tỉnh Bến Tre, Sóc Trăng, Vĩnh Long và thành phố Cần Thơ) đã được định danh bằng phản ứng ngưng kết nhanh trên phiến kính, lưu trữ trong tủ đông - 80°C ở bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ và tiến hành phân tích PCR tại bộ môn Thú Y, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ; bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp, trường Đại học Nông nghiệp và Kỹ thuật Tokyo, Nhật Bản, và Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử của Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.

Nguyên liệu dùng cho phản ứng PCR: primer (mỗi xuôi, mỗi ngược của F4, F5, F6, F18, F41, STa, STb, LT và EAST1) (Integrated DNA Technologies, USA); bộ kit PCR, Go Taq® Green Master Mix, 2X (Promega, USA); thang DNA 100 bp (Gel loading buffer – Invitrogen) (Promega, USA).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Ly trích DNA

DNA của các chủng vi khuẩn nhóm ETEC được ly trích bằng phương pháp đun sôi (Boiling methodology). Cho khuẩn lạc vi khuẩn *E. coli* vào ống typ 1,5 ml có chứa 200 µl nước (không có enzyme Dnase, Rnase), đun cách thủy ở 100°C trong 5 phút, ngay lập tức ngâm vào nước đá trong 5 phút. Ly tâm 13.000 vòng trong 2 phút. Phần nước nổi bên trên có chứa DNA của tế bào vi khuẩn được hút ra cho vào 1 ống typ khác và bảo quản ở -20°C (Costa *et al.*, 2010).

2.2.2 Xác định gene độc lực của vi khuẩn ETEC

Phương pháp xác định gene độc lực của vi khuẩn bằng phản ứng PCR, phát hiện gene qui định kháng nguyên bám dính (F4, F5, F6, F18 và F41) và độc tố đường ruột (LT, STa, STb, EAST1) với các cặp mồi đặc hiệu được mô tả trong Bảng 1.

Thành phần các chất trong phản ứng PCR gồm: 25 µl Gotaq green Master Mix 2X (Promega, USA); 1 µl mồi xuôi (10 µM); 1 µl mồi ngược (10 µM); 18 µl nước (không Dnase, Rnase) và 5 µl DNA mẫu.

Bảng 1: Trình tự các nucleotide của các cặp mồi được sử dụng trong phản ứng PCR

STT	Yếu tố độc lực	Trình tự các nucleotide của các cặp mồi	Kích cỡ sản phẩm PCR (bp)	Tài liệu tham khảo
1	F4 (<i>faeG</i>)	GAA TCT GTC CGA GAA TAT CA GTT GGT ACA GGT CTT AAT GG	499	Boerlin <i>et al.</i> , 2005
2	F5 (<i>fanA</i>)	TAT TAT CTT AGG TGG TAT GG GGT ATC CTT TAG CAG CAG TAT TTC	314	Franck <i>et al.</i> , 1998
3	F6 (<i>fasA</i>)	GTA ACT CCA CCG TTT GTA TC AAG TTA CTG CCA GTC TAT GC	409	Boerlin <i>et al.</i> , 2005
4	F18 (<i>fedA</i>)	GTG AAA AGA CTA GTG TTT ATT TC CTT GTA AGT AAC CGC GTA AGC	510	Hung <i>et al.</i> , 2007
5	F41	GCA TCA GCG GCA GTA TCT GTC CCT AGC TCA GTA TTA TCA CCT	380	Franck <i>et al.</i> , 1998
6	LT (<i>elt</i>)	ATT TAC GGC GTT ACT ATC CTC TTT TGG TCT CGG TCA GAT ATG	281	Hung <i>et al.</i> , 2007
7	STa (<i>estA</i>)	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA	190	Franck <i>et al.</i> , 1998
8	STb (<i>estB</i>)	GCC TAT GCA TCT ACA CAA TC TGA GAA ATG GAC AAT GTC CG	279	Ojeniyi <i>et al.</i> , 1994
9	EAST1 (<i>astA</i>)	TCG GAT GCC ATC AAC ACA GT GTC GCG AGT GAC GGC TTT GTA AG	125	Boerlin <i>et al.</i> , 2005

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả xác định một số kháng nguyên bám dính của các chủng ETEC

Để gây bệnh cho heo vi khuẩn *E. coli* thuộc nhóm ETEC phải bám dính vào các thụ thể trên tế bào nhung mao ruột non của heo, từ đó xâm nhập

vào tế bào biểu mô, ở đây vi khuẩn sản sinh độc tố đường ruột. Vì vậy, kháng nguyên bám dính có vai trò rất quan trọng đối với quá trình gây bệnh của ETEC. Kết quả phân tích các kháng nguyên bám dính từ 90 chủng ETEC gây bệnh tiêu chảy ở heo con được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2: Sự lưu hành của các kháng nguyên bám dính của các chủng ETEC ở 4 tỉnh

Địa điểm	Các chủng mang các yếu tố gây bệnh							
	F4		F5		F6		F18	
	SCDT	Tỷ lệ (%)	SCDT	Tỷ lệ (%)	SCDT	Tỷ lệ (%)	SCDT	Tỷ lệ (%)
Cần Thơ (n=13)	6	46,15	2	15,38	1	7,69	0	0,00
Vĩnh Long (n=49)	6	12,24	3	6,12	1	2,04	4	8,16
Sóc Trăng (n=12)	2	16,67	0	0,00	1	8,33	9	75,00
Bến Tre (n=16)	0	0,00	3	18,75	2	12,5	3	18,75
Tổng (n=90)	14	15,56 ^a	8	8,89 ^{a,b}	5	5,56 ^b	16	17,78 ^a

SCDT (số chủng dương tính); các giá trị cùng 1 hàng với những chữ số hoàn toàn khác nhau thì khác nhau rất có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Kết quả xác định gene mã hóa các yếu tố bám dính gây bệnh được thực hiện trên 90 chủng ETEC phân lập từ heo con tiêu chảy cho thấy tỷ lệ các chủng gây tiêu chảy ở heo con có mang gene qui định kháng nguyên bám dính F4 (15,56%), F5 (8,89%) và F18 (17,78%), tỷ lệ này khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), chứng tỏ ba loại kháng nguyên bám dính F4, F5 và F18 phổ biến ở các địa phương này, riêng F6 chiếm tỷ lệ thấp nhất (5,56%) và không có chủng nào mang gene mã hóa F41. Các chủng ETEC mang kháng nguyên F4, F5, F6 và F18 khu trú và hoạt động

trong đường ruột của heo ở 4 tỉnh thuộc ĐBSCL có thể là nguyên nhân gây bệnh tiêu chảy cho heo khi sức đề kháng của heo con giảm sút. Kết quả nghiên cứu này giống với kết quả nghiên cứu của Võ Thành Thìn (2012) ở Nam Trung Bộ và Tây Nguyên và Nguyen Thi Lan *et al.* (2009) ở một số tỉnh miền Bắc và những nghiên cứu này có điểm chung là gene qui định F4 và F18 luôn chiếm tỷ lệ cao. Tuy nhiên, tỷ lệ gene mã hóa yếu tố bám dính F6 luôn cao hơn F5, đối lập với kết quả của nghiên cứu này (F5 được tìm thấy phổ biến hơn F6). Cũng giống với nghiên cứu của Costa *et al.* (2010) ở

Tiểu bang Santa Catarina (Bra-xin), F4 (18,75%) và F18 (26,56%) luôn là những yếu tố bám dính phổ biến gây bệnh trên heo con, tuy nhiên trong nghiên cứu của họ phát hiện F41 chiếm tỷ lệ khá cao (10,94%); và không tìm thấy F6. Các nghiên cứu trên cho thấy các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ phân heo con tiêu chảy mang kháng nguyên bám dính khác nhau theo từng thời điểm, địa điểm nghiên cứu cũng như đặc điểm dịch tễ của bệnh, vì vậy kết quả phân tích các loại kháng nguyên bám dính sẽ có sự sai khác.

Qua khảo sát thực tế, phát hiện một số trang trại và nông hộ ở tỉnh Bến Tre, Vĩnh Long và thành phố Cần Thơ có tiêm phòng vaccine *E. coli* cho heo mẹ trong thời gian mang thai, với các loại vaccine như sau: vaccine Colisuin C.L. do công ty Hipra sản xuất, vaccine có chứa các loại độc lực F4 (ab và ac), F5, F6, LT; vaccine Litterguard LT-C

của công ty Pfizer có chứa F4, F5, F6, F41 và vaccine Neocolipor do công ty Merial sản xuất có mang F4, F5, F6, F41, nhưng bệnh này vẫn chiếm tỷ lệ cao. Riêng tỉnh Sóc Trăng không có tiêm phòng *E. coli* ở thời điểm lấy mẫu thực hiện đề tài, trước đó khoảng 1 năm phần lớn người chăn nuôi đã ngưng tiêm phòng 1 trong 3 loại vaccin *E.coli* trên, vì bệnh vẫn xảy ra sau khi đã tiêm phòng. Thật vậy, các loại vaccine mà người chăn nuôi đã sử dụng chủ yếu mang 4 loại F4, F5, F6 và F41, nhưng thực tế các chủng ETEC gây bệnh trong nghiên cứu này ngoài các kháng nguyên F4, F5 và F6 không có mang F41, tuy nhiên F18 hiện diện với tỷ lệ khá cao ở phân heo con tiêu chảy. Kết quả này đã góp phần chứng minh tại sao người chăn nuôi đã tiêm phòng vaccine phòng bệnh *E. coli* nhưng vẫn không bảo vệ được đàn heo của họ.

Bảng 3: Sự lưu hành của các kháng nguyên bám dính của các chủng ETEC theo nhóm tuổi

Kháng nguyên bám dính	Các chủng mang các yếu tố gây bệnh ở 2 nhóm tuổi			
	Heo con theo mẹ (n=49)		Heo con sau cai sữa (n=41)	
	SCDT	Tỷ lệ (%)	SCDT	Tỷ lệ (%)
F4	8	16,33	6	14,63
F5	3	6,12	5	12,20
F6	4	8,16	1	2,44
F18	5	12,20 ^a	11	22,45 ^b
Ít nhất 1KNBD	20	$p > 0,05$ 40,82	23	$p < 0,05$ 56,10

SCDT (số chủng dương tính); KNBD: kháng nguyên bám dính; các giá trị cùng 1 hàng với những chữ số hoàn toàn khác nhau thì khác nhau rất có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$

Có 20/49 chủng *E. coli* phân lập từ heo con theo mẹ tiêu chảy mang ít nhất 1 loại kháng nguyên bám dính (40,82%), trong đó chủng mang F4 (16,33%) và F18 (12,2%) được tìm thấy cao hơn F5 (6,12%) và F6 (8,16%), nhưng khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Kết quả phân tích các loại kháng nguyên F4, F5, F6 và F18 đều là những kháng nguyên tham gia gây bệnh tiêu chảy ở heo con ở bốn tỉnh ĐBSCL.

Từ 41 chủng *E. coli* phân lập ở heo sau cai sữa bị tiêu chảy thì tỷ lệ mang gene bám dính F18 cao nhất (22,45%), tiếp theo là F4 (14,63%), F5 (12,20%), F6 (2,44%) với $p < 0,05$. Điều này giống với nghiên cứu của Frydendahl (2002), Vũ Khắc Hùng và ctv (2005)^a và Võ Thành Thìn (2012), các tác giả này cho rằng F18 là kháng nguyên bám dính chính của các chủng *E. coli* phân lập từ heo sau cai sữa mắc bệnh tiêu chảy. Tỷ lệ các chủng *E. coli* mang F18 phân lập từ heo sau cai sữa (22,45%) cao hơn ở heo theo mẹ (12,20%) rất có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Kết quả này là do các thụ

thể của F18 ít có mặt ở heo mới sinh và sẽ tăng dần đến cai sữa, chúng cũng tiếp tục tồn tại ở heo trưởng thành, vì vậy F18 là kháng nguyên bám dính chính của các chủng phân lập được từ những heo con sau cai sữa bị bệnh tiêu chảy (Gyles and Fairbrother, 2010). Kháng nguyên bám dính F4 không khác nhau giữa heo theo mẹ (16,33%) và heo sau cai sữa (14,63%), vì F4 gắn vào thụ thể ở tế bào biểu mô ruột non của heo ở mọi lứa tuổi (heo theo mẹ, heo sau cai sữa và cả heo thịt) (Gyles and Fairbrother, 2010). Các thụ thể để F4 bám vào có nhiều ở heo con theo mẹ và chúng sẽ giảm dần theo tuổi, nhưng vẫn còn ổn định trong suốt thời gian cai sữa và sau cai sữa (Nagy and Fekete, 1999). Khác với sự hiện diện của kháng nguyên bám dính F18, các chủng ETEC có mang F5 và F6 chiếm tỷ lệ thấp, tương đương nhau ở 2 nhóm tuổi ($p > 0,05$). Giống như nhận định của Gyles and Fairbrother (2010), cho rằng phần lớn các thụ thể của kháng nguyên F5 và F6 kết dính dịch nhày ở phần sau của ruột non của heo theo mẹ. Bên cạnh

đó, những nghiên cứu gần đây cho biết hai loại kháng nguyên bám dính này thường chiếm tỷ lệ thấp, nhưng chúng cũng đóng vai trò nhất định trong gây rối loạn tiêu hóa ở heo con.

3.2 Kết quả xác định một số độc tố ruột của các chủng ETEC

Trong 90 chủng ETEC được phân lập từ heo con tiêu chảy có 30 chủng mang gene mã hóa độc tố STb, chiếm tỷ lệ cao nhất (33,33%), tiếp theo là EAST1 (27,78%), STa (15,56%) và LT (12,22%). Trong đó, STb và EAST1 tương đương nhau ($p>0,05$), nhưng giữa STb và EAST1 khác nhau rất

có ý nghĩa thống kê với STa và LT ($p<0,01$). Kết quả STb chiếm tỷ lệ cao nhất trong nghiên cứu này giống với phần lớn các nghiên cứu ở Việt Nam, như Cù Phú Hữu và ctv (2003), Nguyễn Ngọc Tuấn và ctv (2005), Do et al. (2006), Phạm Thế Sơn (2008) và Võ Thành Thìn (2012); kể cả những nghiên cứu ở nước ngoài, như Blanco et al. (2006) và Zhang et al. (2007). Tóm lại, kết quả nghiên cứu này và các nghiên cứu khác đều có điểm chung là khả năng sinh độc tố STb của các chủng vi khuẩn ETEC luôn chiếm tỷ lệ cao nhất, chứng tỏ sự phổ biến của độc tố STb trong bệnh tiêu chảy do *E. coli* ở heo con.

Bảng 4: Kết quả xác định các độc tố ruột ở các chủng ETEC ở 4 tỉnh

Địa điểm	Các chủng mang các yếu tố gây bệnh							
	STa		STb		LT		EAST1	
	SCDT	Tỷ lệ (%)	SCDT	Tỷ lệ (%)	SCDT	Tỷ lệ (%)	SCDT	Tỷ lệ (%)
Cần Thơ (n=13)	3	23,08	5	38,46	3	23,8	4	30,77
Vĩnh Long (n=49)	4	8,16	10	20,41	3	6,12	7	14,29
Sóc Trăng (n=12)	7	58,33	11	91,67	4	33,33	9	75,00
Bến Tre (n=16)	0	0,00	4	25,00	1	6,25	5	31,25
Tổng (n=90)	14	15,56 ^b	30	33,33 ^a	11	12,22 ^b	25	27,78 ^a

SCDT (số chủng dương tính); các giá trị cùng 1 hàng với những chữ số hoàn toàn khác nhau thì khác nhau rất có ý nghĩa thống kê ($p<0,01$).

Sự phân bố từng loại độc tố ruột của chủng ETEC giữa các tỉnh không có khác biệt thống kê. Riêng độc tố STa hiện diện ở các chủng ETEC phân lập từ heo con tiêu chảy ở 2 tỉnh Sóc Trăng, Vĩnh Long và thành phố Cần Thơ tương đương nhau nhưng rất khác biệt thống kê so với tỉnh Bến Tre (0%). Kết quả này đã chứng minh tiêm vaccine phòng bệnh *E. coli* ở một số trang trại và nông hộ ở tỉnh Bến Tre, Vĩnh Long và Thành phố Cần Thơ không có hiệu quả. Trên thực tế các

trang trại và nông hộ này sử dụng một trong ba loại vaccine trên, trong đó chỉ có 1 loại vaccine mang độc tố LT, nhưng tỷ lệ các chủng ETEC mang độc tố LT ở nghiên cứu này thấp nhất (12,22%). Như vậy, kết quả nghiên cứu đã chứng minh những loại vaccine trên chưa đáp ứng với thực tế nhiễm các loại độc tố ruột của các chủng ETEC ở 4 tỉnh ĐBSCL, đó cũng là lý do tại sao thời gian gần đây người chăn nuôi không tiêm vaccine phòng bệnh *E. coli*.

Bảng 5: Kết quả xác định các độc tố ruột ở các chủng ETEC theo nhóm tuổi

Độc tố	Các chủng mang các yếu tố gây bệnh ở 2 nhóm tuổi			
	Heo con theo mẹ (n=49)		Heo con sau cai sữa (n=41)	
	SCDT	Tỷ lệ (%)	SCDT	Tỷ lệ (%)
STa	7	14,29 ^b	7	17,07
STb	19	38,78 ^a	11	26,83
LT	5	10,20 ^b	6	14,63
EAST1	15	30,61 ^a	10	24,39
Có ít nhất 1 độc tố	24	48,98	18	43,90

SCDT (số chủng dương tính); các giá trị cùng 1 cột với những chữ số hoàn toàn khác nhau thì khác nhau rất có ý nghĩa thống kê ($p<0,01$)

Trong 49 chủng ETEC phân lập từ heo con theo mẹ có 24 chủng có khả năng sinh ít nhất một loại độc tố (48,98%), trong đó chủng mang gene mã

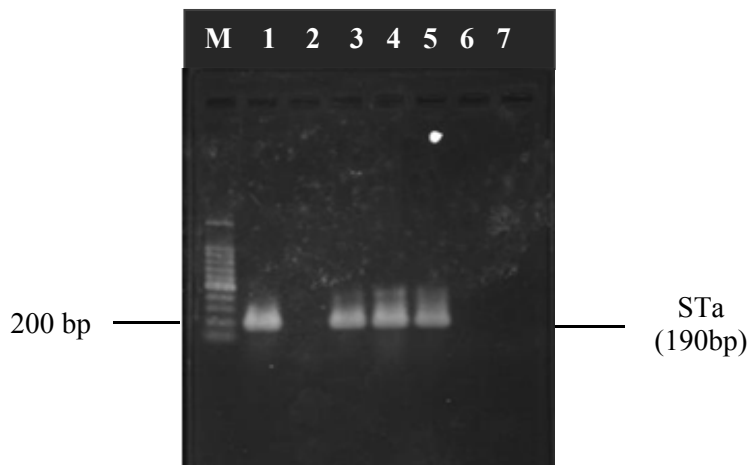
hóa độc tố STb (38,78%) và EAST1 (30,61%) chiếm tỷ lệ cao nhất, giữa chúng không khác biệt thống kê ($p>0,05$), tuy nhiên chúng khác nhau rất

có ý nghĩa thống kê so với STa (14,29%) và LT (10,2%). Bên cạnh đó, kết quả xác định gene ở 41 chủng ETEC phân lập từ heo sau cai sữa thì STb (26,83%) và EAST1 (24,39%) chiếm tỷ lệ cao hơn STa (17,07%) và LT (14,63%), nhưng sự khác nhau giữa 4 loại độc tố này không có ý nghĩa thống kê (với $p > 0,05$). Kết quả này chứng minh 4 loại độc tố trên đều có khả năng gây bệnh trên heo sau cai sữa. Như vậy, ở cả hai nhóm tuổi cho thấy vai trò của STb và EAST1 rất quan trọng trong việc gây tiêu chảy.

Tỉ lệ các chủng ETEC mang gene mã hóa từng loại độc tố STa, STb, LT và EAST1 trong nghiên cứu này không có sự sai khác giữa 2 nhóm heo con tiêu chảy. Theo một số tác giả như Harel *et al.* (1991), Ojeniyi *et al.* (1996), các chủng ETEC sản sinh độc tố STa, STb và LT thường đóng vai trò quan trọng trong bệnh tiêu chảy ở heo con theo mẹ, đặc biệt ở giai đoạn từ sơ sinh đến 7 ngày tuổi. Tuy nhiên, những nghiên cứu gần đây cho thấy các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ heo con sau cai sữa có khả năng sản sinh độc tố đường ruột với tỷ lệ rất cao. Kết quả nghiên cứu của một số tác giả trong nước cho thấy trên 50% số chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ nhóm heo này có mang gene mã hóa độc tố đường ruột như STa, STb và LT (Nguyễn Cảnh Dũng và Cù Hữu Phú, 2011; Phạm Thế Sơn và *ctv.*, 2008; Do *et al.*, 2006). Tỷ lệ chủng ETEC có nguồn gốc từ heo sau cai sữa tiêu chảy ở Cuba và Mỹ sản sinh những độc tố này cũng rất cao, như STa (57,7- 61%), STb (27,4 - 72,6%) và LT (17,4 - 53%) (Blanco *et al.*, 2006;

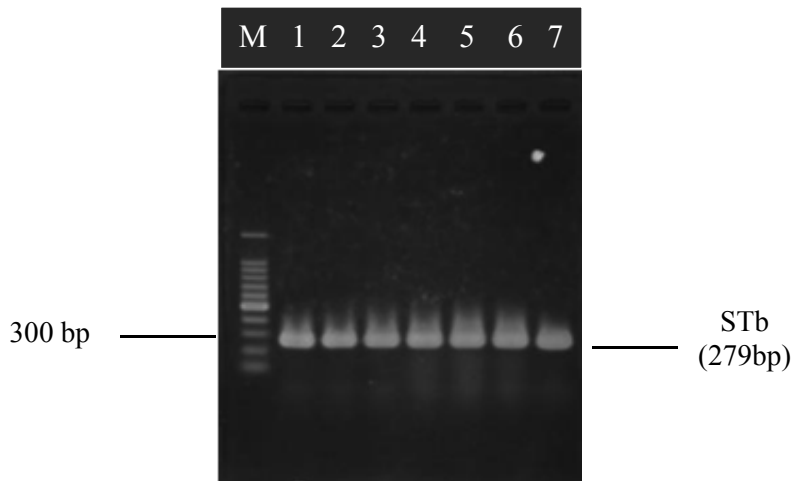
Zhang *et al.*, 2007). Như vậy, vai trò gây bệnh của các loại độc tố ruột ở từng nhóm tuổi đều rất quan trọng.

Hiện nay, vai trò của EAST1 trong việc gây bệnh tiêu chảy ở heo con chưa được xác định rõ (Gyles and Fairbrother, 2010). Nếu *E. coli* chỉ sản xuất có 1 loại độc tố là EAST1 thì không đủ để gây tiêu chảy (Ngeleka *et al.*, 2003). Tuy nhiên, nếu EAST1 kết hợp với LT thì dễ dàng gây tiêu chảy hơn so với chỉ có LT (Berberrov *et al.*, 2004). Một số nghiên cứu từ các tác giả khác như Choi *et al.* (2001); Frydendahl (2002); Osek (2003); Hung *et al.* (2006) cho rằng độc tố EAST1 thường được tìm thấy ở các chủng ETEC phân lập từ heo con sau cai sữa mắc bệnh tiêu chảy. Qua nghiên cứu, Vũ Khắc Hùng và *ctv.* (2005)^b thấy rằng độc tố EAST1 có tương quan thuận với yếu tố bám dính F4 và độc tố STb, từ đó tác giả nhận định độc tố EAST1 có thể là tác nhân gây tiêu chảy ở heo con. Trong kết quả nghiên cứu này, các chủng ETEC phân lập từ heo con tiêu chảy trước và sau cai sữa đều có mang gene mã hóa độc tố EAST1 với tỷ lệ khá cao (30,61% và 24,39%) và hầu hết đều có kết hợp với các chủng mang kháng nguyên F4 và F18. Ngoài ra, mối quan hệ của EAST1 và STb cũng được thấy rất rõ, phần lớn các chủng ETEC sản sinh độc tố STb (dạng đơn lẻ hay kết hợp với 1 hoặc nhiều loại độc tố khác) đều có sản sinh EAST1. Qua các mối quan hệ của F4, F18, STb và EAST1 đã cho thấy vai trò của độc tố EAST1 trong bệnh tiêu chảy ở heo con trước và sau cai sữa.



Hình 1: Sản phẩm phản ứng PCR xác định STa (190bp) trên thạch agarose

M: DNA marker 100bp; giếng 1: đối chứng dương; giếng 2 và 6: âm tính; giếng 3, 4, 5 (CT28a, VL19h, VL28d): dương tính; giếng 7: đối chứng âm



Hình 2: Sản phẩm phản ứng PCR xác định STb (279bp) trên thạch agarose

M: DNA marker 100bp; giếng 1: đối chứng dương; giếng 2-7 (932a, VL28d, VL32a, VL39a, ST53a, ST55e): dương tính



Hình 3: Sản phẩm phản ứng PCR xác định F18 (510bp) trên thạch agarose

Giếng 1: đối chứng âm; giếng 2-6 và 13-15: âm tính; giếng 7-12 (VL19h, VL32a, ST53c, ST55a, ST61b và ST62g): dương tính; giếng 16: đối chứng dương; M: DNA marker 1000bp

3.3 Tổ hợp các yếu tố gây bệnh của các chủng ETEC phân lập từ phân heo con tiêu chảy

Để gây bệnh tiêu chảy, các chủng ETEC cần có yếu tố bám dính và khả năng tiết độc tố, các độc tố này làm rối loạn sự cân bằng nước và chất điện giải trong cơ thể vật chủ. Các yếu tố bám dính và độc tố đường ruột này thường kết hợp với nhau thành những tổ hợp đặc trưng để gây bệnh. Những tổ hợp này được thể hiện ở Bảng 6.

Qua khảo sát 90 chủng ETEC gây bệnh tiêu chảy trên heo con phát hiện 44 chủng mang các tổ hợp gene khác nhau, trong đó có 2 chủng có mang F4 nhưng không sản xuất độc tố và 1 chủng ETEC không có kháng nguyên bám dính nhưng sản xuất 2 loại độc tố (STb/EAST1). Trong các tổ hợp gene giữa yếu tố bám dính và độc tố ruột có 7/44 chủng mang tổ hợp F18/STa/STb/EAST1, chiếm tỷ lệ cao nhất (15,91%). Các tổ hợp còn lại phối hợp khá đồng đều giữa các loại độc tố ruột và kháng

nguyên bám dính. Điều này cho thấy, các chủng khác nhau thì khả năng sinh ra các loại độc tố với tỷ lệ khác nhau. Tổ hợp gene phổ biến trong nghiên cứu này không giống một số nghiên cứu gần đây ở trong nước cũng như ngoài nước. Theo Võ Thành Thìn (2012), trong các tổ hợp gene kháng nguyên bám dính phổ biến là F4/STb/LT. Nghiên cứu của Nguyen Thi Lan *et al.* (2009) khi xác định một số yếu tố độc lực của vi khuẩn *Escherichia coli* phân lập từ heo con tiêu chảy ở các tỉnh Bắc Ninh, Hưng Yên, Hải Dương, Bắc Giang và Hà Tây cho thấy kiểu kết hợp F4/ LT/STb, F4/STb, F6/STa chiếm ưu thế nhất. Kết quả nghiên cứu của Choi *et al.*, (2001) tại Hàn Quốc cho thấy tỉ lệ các tổ hợp gene của vi khuẩn *E. coli* ở heo con tiêu chảy là F5/STa (22,5%), F6/STa (7,5%), F4/STa/STb/LT (5%), F4/STb/LT (2,5%), F6/STa/STb (2,5%). Như vậy, các chủng ETEC gây bệnh mang các loại độc lực khác nhau ở từng vùng và từng thời điểm nghiên cứu.

Bảng 6: Tổ hợp gene qui định các yếu tố bám dính và độc tố của các chủng ETEC gây bệnh tiêu chảy trên heo con

STT	Tổ hợp gene độc lực của ETEC	Số lượng	Tỷ lệ (%)
1	F4	2	4,55
2	F4/STb	2	4,55
3	F4/EAST1	2	4,55
4	F4/STb/LT	3	6,82
5	F4/STb/EAST1	2	4,55
6	F4/STa/STb/LT	2	4,55
7	F4/STb/LT/EAST1	1	2,27
8	F5/STa	1	2,27
9	F5/STb	1	2,27
10	F5/LT	1	2,27
11	F5/EAST1	2	4,55
12	F5/STa/EAST1	1	2,27
13	F5/STb/EAST1	1	2,27
14	F5/STa/STb/EAST1	1	2,27
15	F6/STa	1	2,27
16	F6/STb	3	6,82
17	F6/STa/STb	1	2,27
18	F18/STb	1	2,27
19	F18/EAST1	3	6,82
20	F18/STb/LT	1	2,27
21	F18/STb/EAST1	1	2,27
22	F18/LT/EAST1	1	2,27
23	F18/STa/STb/EAST1	7	15,91
24	F18/STb/LT/EAST1	2	4,55
25	STb/ EAST1	1	2,27
Tổng cộng		44	100

Kết quả nghiên cứu này cho thấy phần lớn các chủng *E. coli* F4, F5, F6 và F18 đều có mang ít nhất một độc tố ruột (STa hoặc STb), trong đó có một số chủng F4, F5 và F18 mang cả bốn loại độc tố ruột (STa, STb, LT và EAST1), điều này chứng tỏ các chủng ETEC có mang gene độc lực đóng một vai trò quan trọng trong hội chứng tiêu chảy ở heo con theo mẹ và sau cai sữa.

4 KẾT LUẬN

Các chủng ETEC gây tiêu chảy heo con ở 4 tỉnh ĐBSCL phổ biến nhất là F4 và F18 kế đến là F5 và F6. Độc tố ruột STb và EAST1 là 2 loại độc tố chính gây bệnh tiêu chảy heo con tại các tỉnh này, tiếp theo là LT, STa. Các chủng có mang kháng nguyên bám dính F18 kết hợp với độc tố ruột STa, STb và EAST1 chiếm ưu thế ở các tỉnh Bến Tre, Sóc Trăng, Vĩnh Long và Thành phố Cần Thơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Berberov, E.M., Zhou, Y., Francis, D.H., Scott, M.A., Kachman, S.D. and Moxley, R.A., 2004. Control of *Escherichia coli* in weaned pigs by use of oral immunization combined with a diet low in nutrients. *Fortschr Veterinary Medicine*. 29: 78 – 81.
- Blanco M., Lazo L., Blanco J.E., Dahbi G., Mora A., López C. and González E.A., Blanco J., 2006. Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuban pigs with diarrhea. *International Microbiology*. 9: 53-60.
- Boerlin P., Travis R., Gyles C.L., Reid-Smith R., Janecko N., Lim H., Nicholson V., McEwen S.A., Friendship R., and Archambault M., 2005. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 6753-6761.
- Bùi Trung Trực, Nguyễn Việt Nga, Thái Quốc Hiếu, Lê Thanh Hiếu, Nguyễn Ngọc Tuấn và Trần Thị Dân, 2004. Phân lập và định typ kháng nguyên vi khuẩn *E. coli* trong phân heo nái, heo con tại tỉnh Tiền Giang. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*. 1: 12- 19.
- Choi, C., Cho, W.S., Chung, H.K., Jung, T., Kim, J. and Chae, C., 2001. Prevalence of the enteroaggregative *E. coli* heat-stable enter-otoxin 1 (EAST1) gene in isolates in weaned pigs with diarrhea and/or edema disease. *Veterinary Microbiology*. 81: 65–71.
- Costa, M.M., Drescher, G., Maboni, F., Weber, S.S., Schrank, A., Vainstein, M.H., Schrank, I.S. and Vargas, A.C., 2010. Virulence factors, antimicrobial resistance, and plasmid content of *Escherichia coli* isolated in swine commercial farms. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 62: 30 – 36.
- Cù Hữu Phú, Nguyễn Ngọc Nhiên, Đỗ Ngọc Thúy, Nguyễn Xuân Hiền, Âu Xuân Tuấn, Văn Thị Hường, Đào Thị Hào và Vũ Ngọc Quý, 2003. *Kết quả điều tra tình hình tiêu chảy của heo con theo mẹ tại một số trại heo miền bắc Việt Nam, xác định tỷ lệ kháng kháng sinh và các yếu tố gây bệnh của các chủng E. coli phân lập được*. Báo

- cáo khoa học chăn nuôi thú y, phần thú y. NXB Nông nghiệp Hà Nội. 106-118.
8. Do T.N., Cu H.P., Van T. H., Tran. T.P., and Trott D., 2006. Virulence factors of *E. coli* isolates obtained from pigs with post-weaning diarrhoea or oedema disease in Vietnam. In: Evans, P. *Proceeding of the 20th International Pig Veterinary Society congress, June 22-26. Durban, South Africa.* 2: 336.
 9. Fairbrother, J. M., Bertschinger, H. U., Nielsen, N. O. and Pohlenz, J. F., 1992. “*Escherichia coli* infections”. In: Leman, A. D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., Allaire, S.D. and Taylor, D.J. *Disease of swine.* 7th ed. *Iowa State University Press, Ames, Iowa.* 1150 pp.
 10. Franck, S. M., Bosworth, B. T. and Moon H.W., 1998. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin – producing *Escherichia coli* strains from calves. *Journal of Clinical Microbiology.* 36:1795-1797.
 11. Frydendahl K., 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhea and edema disease in pigs and comparison of diagnostic approaches. *Veterinary Microbiology.* 85: 169-182.
 12. Gyles, C.L. and Fairbrother, J.M., 2010. “*Escherichia coli*” in Gyles, C.L., Prescott, J.F, Songer G., Thoen C.O (eds). *Pathogenesis of bacterial infections in animals* (4th). *Iowa State University Press, Ames, Iowa.* 643 pp.
 13. Harel J., Lapointe H., Fallara A., Lortie L.A., Bigras-Poulin M., Larivière S. and Fairbrother J.M., 1991. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology.* 29: 745-752.
 14. Hung, V.K., Holoda E., Pilipcinec E., Blanco M., Blanco J. E., Mora A., Dahbi G., Lopez C., Gonzalez E. A. and Blanco J., 2006. Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Slovakia. *BMC Veterinary Research.* 20: 2-10
 15. Hung, V.K., Holoda E., Pilipcinec E., Blanco M., Blanco J. E., Dahbi G., Mora A., Lopez C., Gonzalez E. A., Blanco J., 2007. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea in Slovakia. *Veterinary Journal.* 174:176-187.
 16. Lý Thị Liên Khai, Phạm Quốc Vương, Hideki, K., Trần Thị Phấn, Châu Bá Lộc, Yamasaki, S. và Taniguchi, T., 2003. Phân lập, định danh và điều trị bệnh tiêu chảy cho heo con gây ra do Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 và 987P ở tỉnh Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ.* 5: 124-133.
 17. Nagy B., and Fekete P. Z., 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in farm animals. *Veterinary Research.* 30: 259 – 284.
 18. Ngeleka M., Pritchard J., Appleyard G., Middleton D.M. and Fairbrother J.M., 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 3: 242-252.
 19. Nguyễn Cảnh Dũng và Cù Hữu Phú, 2011. Xác định vai trò gây bệnh của *E. coli*, *Salmonella* spp trong hội chứng tiêu chảy ở heo sau cai sữa tại một số địa phương tỉnh Lâm Đồng. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y.* 1: 56-64.
 20. Nguyễn Khả Ngự và Lê Văn Tạo, 1996. Tình hình bệnh trực khuẩn *E. coli* ở lợn con trước và sau cai sữa tại 1 số tỉnh ĐBSCL. *Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y.* 4: 50-55.
 21. Nguyễn Ngọc Tuấn, Bùi Thị Thu Trang, Lê Thị Mai Khanh và Trần Thị Dân, 2005. Phát hiện một số gene độc lực của *Escherichia coli* trong phân bò, heo bằng kỹ thuật multiplex-PCR. *Tạp chí khoa học Thú y.* 5: 18-25.
 22. Nguyen Thi Lan, Truong Ha Thai and Nguyen Van Giap, 2009. Determining virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhea piglets by using PCR method. *Journal science and development.* 7: 187-191.
 23. Ojeniyi B., Ahrens P. and Meyling A., 1994. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase

- chain reaction and phenotypic assays. *Zentralbl Veterinarmed B.* 41: 49-59.
24. Osek, J., 2003. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene its relationship with fimbrial and enterotoxin markets in *E. coli* isolated from pigs with diarrhoea. *Veterinary Microbiology.* 91: 65-72.
 25. Phạm Thế Sơn, Lê Văn Tạo, Cù Hữu Phú và Phạm Khắc Hiếu, 2008. Đặc tính của vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella* spp và *C. perfringens* gây bệnh heo con tiêu chảy. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y.* 1: 73-77.
 26. Võ Thành Thìn, 2012. *Nghiên cứu xác định 1 số yếu tố độc lực của vi khuẩn Escherichia coli gây bệnh tiêu chảy ở lợn con ở khu vực Nam Trung Bộ và Tây Nguyên.* Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Hà Nội.
 27. Vũ Khắc Hùng, Lê Văn Tạo và Pilipinec. 2005^a. Xác định các loại kháng nguyên bám dính thường gặp của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ lợn con bị tiêu chảy bằng phản ứng PCR. *Khoa học kỹ thuật thú y.* 2: 54 – 62.
 28. Vũ Khắc Hùng, Lê Văn Tạo và Pilipinec. 2005^b. Xác định các loại độc tố thường gặp ở vi khuẩn *E. coli* phân lập từ lợn con bị tiêu chảy bằng phản ứng PCR. *Khoa học kỹ thuật thú y.* 3: 22 – 28.
 29. Zhang W., Zhao M., Ruesch L., Omot A. and Francis D., 2007. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Veterinary Microbiology.* 123: 145-152.