

PHÁT HIỆN MỘT SỐ GEN ĐỘC LỰC CỦA *ESCHERICHIA COLI* TRÊN THỊT BÒ, HEO VÀ TRONG PHÂN BÒ, HEO BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX-PCR

DETECTING SOME VIRULENCE GENES OF *ESCHERICHIA COLI* IN CATTLE AND SWINE FAECES, ON BEEF AND PORK MEAT BY MULTIPLEX-PCR

Trần Thanh Phong, Nguyễn Ngọc Tuấn, Bùi Thị Thu Trang và Lê Thị Mai Khanh
 Khoa Chăn nuôi Thú y, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

ABSTRACT

On 20 samples of feces from clinically healthy cattle (10 animals) and pigs (10); 8 samples of beef meat and 23 pork to determine total *Escherichia coli* (*E. coli*) according to FAO (1992) and to detect their virulence genes. On 161 samples include 32 samples of feces taken from scour calves (10 animals), scour piglets (6), scour weaner pigs (16); 46 samples of feces from clinically healthy cattle (21 animals), pigs (25), and 34 samples of beef meat and 49 pork meat to isolate *E. coli* and detect their virulence genes. *E. coli* was isolated on MAC/CT-SMAC (Mac Conkey/Cefixime tellurite sorbitol-MAC) agar at 37°C for 24 hours. For each sample, 4-10 typical colonies of *E. coli* were collected for extraction of DNA by heat. Multiplex-PCR was used to detect gene *eae*, *hly*, *stx1* and *stx2* (PCR1), and gene *stx2e*, *sta*, *stb*, *lt-1* (PCR2) of isolated *E. coli*.

Total *E. coli* on cattle feces were lower than pig ($9.5 \cdot 10^6$ vs $102 \cdot 10^6$ MPN/1gam), in beef meat was higher than pork ($14.8 \cdot 10^4$ vs $0.4 \cdot 10^4$ MPN/1gam). The prevalence of the virulence genes in *E. coli* isolates from animal species and feces conditions was determined. In scour calves the frequency of *E. coli* isolates possessing *stx1*, *hly*, *eae*, *stx2* and *stb* was 40%, 30%, 30%, 20% and 20%, respectively. With scour weaner pigs the prevalence of gene *stb*, *stx2*, *stx2e*, *sta*, *eae* and *hly* in *E. coli* isolates was 81.3%, 50%, 31.3%, 25%, 12.5% and 6.3%, respectively. In clinically healthy cattle *E. coli* isolates carrying gene *stx2*, *stx1*, *hly* and *stb* were 42.9%, 38.1%, 19% and 14.3%. For clinically healthy pig, the detected genes were *stb*, *stx2e*, *hly*, *eae* and *stx2* at the rate of 28%, 16%, 8%, 8% and 4%. On beef meat, *E. coli* isolates carrying gene *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly* and *stb* were 50%, 32.4%, 23.5%, 26.5% and 2.9%, respectively. On pork meat, the detected genes were *stx2*, *eae*, *hly* at the rate of 22.5%, 4.1% and 4.1%.

In general, *E. coli* possessing virulence gene was present in healthy cattle and swine feces, in feces of scour calves and piglets, also on beef and pork meat, specially *E. coli* had the genes Shiga toxin producing (*stx1*, *stx2* and *stx2e*). The risk of *E. coli* with virulence genes to public health should

be raised due to its high occurrence in animal feces and on beef meat.

ĐẶT VẤN ĐỀ

E. coli là một trong những vi khuẩn thường trực trong đường ruột người và động vật. Người ta chia *E. coli* thành nhiều nhóm. Nhóm STEC (Shiga toxin producing *E. coli*) mang nhiều gen độc lực như gen *eae* chịu trách nhiệm sản sinh intimin giúp vi khuẩn bám dính vào niêm mạc ruột và gây hư hại vi nhung mao ruột; gen *hly* sản sinh độc tố gây dung giải hồng cầu; gen *stx1*, *stx2* sản sinh các độc tố Shiga gây hội chứng viêm kết tràng xuất huyết (HC = hemorrhagic colitis) và hội chứng huyết niệu (HUS = hemolytic uremic syndrome) ở người; gen *stx2e* sản sinh độc tố vero gây bệnh phù thũng và tiêu chảy ở heo cai sữa. Trong khi đó nhóm ETEC (Enterotoxigenic *E. coli*) mang gen *lt-1* sản sinh độc tố ruột kém chịu nhiệt (heat labile toxin = LT) và gen *st* sản sinh độc tố ruột chịu nhiệt (heat stable toxin = ST), đó là hai loại độc tố gây tiêu chảy trên người và vật nuôi. Nhóm EPEC (Enteropathogenic *E. coli*) mang gen *eae* sản sinh protein intimin.

Mục tiêu của bài báo là xác định tần số các gen độc lực của *E. coli* trên thịt bò và heo, trong phân bò và heo để nâng cao hiểu biết về *E. coli* gây bệnh cho vật nuôi và gây ngộ độc thực phẩm cho người tiêu dùng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Lấy mẫu

Thịt heo và thịt bò được lấy từ cơ sở giết mổ ở cao điểm hạ thịt bằng cách sử dụng gạc thấm ướt nước muối sinh lý 0,9% tiệt trùng để chà sát mạnh trên bề mặt thịt (200 cm²).

Thu thập mẫu phân bò, heo từ các cơ sở chăn nuôi bằng cách dùng muỗng vô trùng lấy phần giữa cục phân đặc (khoảng 25 g) hoặc tắm bông ngoáy vào trực tràng bê, heo tiêu chảy cho vào môi trường Carry Blair, bảo quản ở 8-10°C, chuyển nhanh về phòng thí nghiệm.

Định lượng và định tính *E. coli*

Định lượng *E. coli* theo qui trình của FAO (1992): mẫu được pha loãng thích hợp và cấy chuyển vào môi trường LTB (Lauryl tryptone broth) ở 35°C/24 giờ. Chọn những ống dương tính chuyển sang EC (enrichment coli) ủ 44,5°C/24-48 giờ và sau đó ria trên thạch EMB, ủ 37°C/24 giờ. Chọn khuẩn lạc điển hình, giữ gốc trên thạch NA để thử IMViC. Tính tổng số *E. coli* bằng cách tra bảng MPN. Song song đó, chọn 4-10 khuẩn lạc điển hình của *E. coli* để ly trích DNA nhằm phát hiện các gen độc lực từ các mẫu định lượng.

Mẫu định tính (phát hiện gen độc lực) được cấy ria trực tiếp trên thạch MAC/CT-SMAC (MacConkey/cefexime tellurite sorbitol-MAC), ủ 37°C trong 24 giờ. Khuẩn lạc điển hình *E. coli* trên MAC có màu đỏ hồng, tròn và lồi, trên CT-SMAC chọn khuẩn lạc hồng lẫn trắng.

Ly trích DNA

Mỗi mẫu chọn đại diện khoảng 4-10 khuẩn lạc điển hình *E. coli* cho vào eppendorf chứa sẵn 0,5ml nước cất hai lần vô trùng, đun sôi 10 phút, trừ ở -

70°C trong 10 phút. Sau khi rã đông, ly tâm 13000 vòng/ phút trong 3 phút, lấy phần dịch phía trên là DNA xét nghiệm.

Phát hiện các gen độc lực

Phát hiện tám gen độc lực của *E. coli* bằng hai phản ứng multiplex-PCR: PCR1 phát hiện các gen *stx1*, *stx2*, *eae* và *hly* với đối chứng dương là EDL 933; PCR2 phát hiện các gen *stx2e*, *sta*, *stb*, *lt-1* với đối chứng dương là H44.

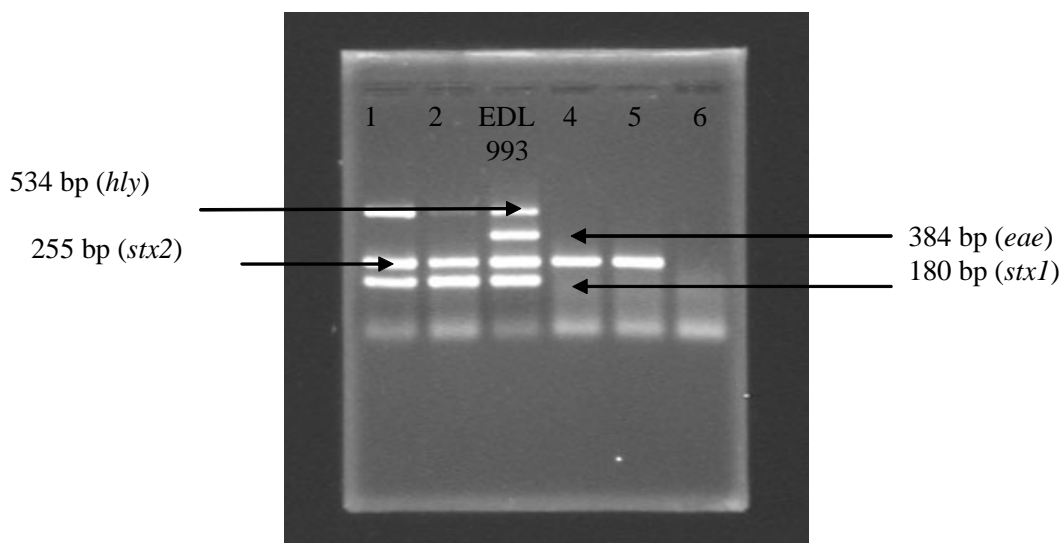
PCR1 phát hiện các gen *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly*

Trình tự các đoạn môi sử dụng trong multiplex – PCR1 (Theo Paton và Paton, 1998)

Hỗn hợp phản ứng 50 µl, gồm các thành phần sau (Paton và Paton, 1998): PCR buffer 1X (75 mM tris-HCl ở pH=8,8, 20 mM NH₄(SO₄)₂); MgCl₂ 2mM; mỗi loại dNTP 200µM; mỗi đoạn môi 250mM; *Taq* 0,5UI (ABgene); DNA xét nghiệm 1 µl và nước cất 2 lần vừa đủ 50 µl.

Phản ứng PCR có 35 chu kỳ nhiệt. Mỗi chu kỳ gồm biến tính 1 phút ở 95-°C; ủ bắt cặp 2 phút ở 65°C trong 10 chu kỳ đầu và sau đó giảm dần đến

| Đoạn môi | Trình tự oligonucleotide (5'→3') | Kích cỡ (bp) |
|-----------------|----------------------------------|--------------|
| Eae – F | GACCCGGCACAAGCATAAGC | 384 |
| Eae – R | CCACCTGCAGCAACAAGAGG | |
| Hly – F | GCATCATCAAGCGTACGTTCC | 534 |
| Hly –R | AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT | |
| Stx1 – F | ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC | 180 |
| Stx1 – R | AGAACGCCCACTGAGATCATC | |
| Stx2 – F | GGCACTGTCTGAAACTGCTCC | 255 |
| Stx2 – R | TCGCCAGTTATCTGACATTCTG | |



Hình 1. Điện di sản phẩm multiplex-PCR để phát hiện gen *eae*, *hly*, *stx1*, *stx2* EDL933 là mẫu đối chứng dương (*stx1*, *stx2*, *eae*, *hly*) và 1, 2, 4, 5,6 là các mẫu xét nghiệm

60°C vào chu kỳ 16 cho đến chu kỳ cuối; và kéo dài 1,5 phút ở 72°C và tăng dần lên 2,5 phút từ chu kỳ 25 đến 35.

Sau khi khuếch đại, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%, mỗi giếng chứa 10 µl sản phẩm khuếch đại trộn với 2 µl loading dye. Thời gian điện di 35 phút, 100 V, 250 mA. Gel được ngâm với TBE có 0,1% ethidium bromide trong 30 phút.

Kết quả được đọc dưới đèn UV, ethidium bromide liên kết với DNA sẽ phát sáng và các băng DNA được xác định bằng cách so sánh với mẫu đối chứng dương EDL 933.

PCR2 phát hiện các gen *stx2e*, *sta*, *stb*, *lt-I* (Dẫn liệu của Blanco và ctv, 1997)

Hỗn hợp phản ứng 50µl gồm PCR buffer 1X (75 mM tris-HCl ở pH=8.8, 20 mM NH₄(SO₄)₂); MgCl₂ 1,5 mM; mỗi loại dNTP 200 µM, mỗi *Stx2e* 225 ng,

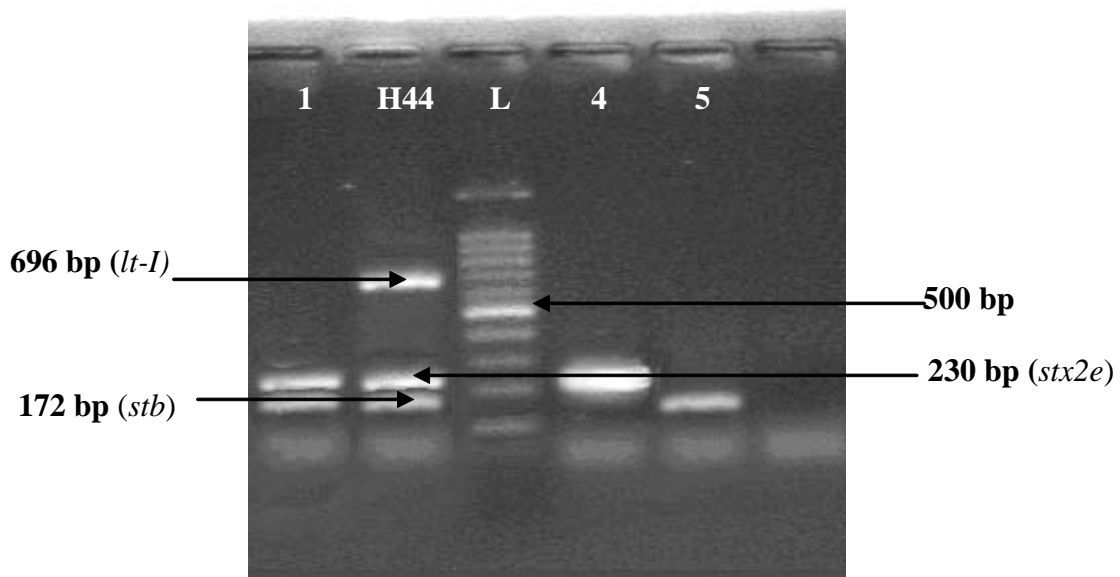
LT-I 150 ng, *STa* 150 ng, *STb* 45 ng, *Taq* – polymerase 0,5 UI (ABgene), DNA xét nghiệm 3 µl và nước cất 2 lần vừa đủ 50 µl.

Quy trình nhiệt gồm: tiền biến tính ở 94°C/5 phút, 25 chu kỳ nhiệt (biến tính 94°C/45 giây, ủ bắt cặp 52°C/45 giây và kéo dài ở 72°C/1 phút), và kéo dài chuỗi 72°C/10 phút (Nguyễn Ngọc Hải, 2002).

Sau khi khuếch đại, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%, mỗi giếng chứa 10 µl sản phẩm khuếch đại trộn với 2 µl loading dye. Thời gian điện di 35 phút, 100 V, 250 mA. Gel được ngâm trong TBE có 0,1% ethidium bromide trong 30 phút.

Kết quả được đọc dưới đèn UV, ethidium bromide liên kết với DNA sẽ phát sáng và các băng DNA được xác định bằng cách so sánh với mẫu đối chứng dương H44 và thang DNA chuẩn (ladder).

| Đoạn mồi | Trình tự oligonucleotide (5'→3') | Kích cỡ (bp) |
|------------------|----------------------------------|--------------|
| Stx2e - F | CCTTAAC TAAAAGGAATATA | 230 |
| Stx2e - R | CTGGTGGTGTATGATTAATA | |
| LT-I - F | GGCGACAGATTATACCGTGC | 696 |
| LT-I - R | CCGAATTCTGTTATATATATGTC | |
| STa - F | TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG | 147 |
| STa - R | CTTGACTCTTCAAAGAGAAAATTAC | |
| STb - F | ATCGCATTTCTTCTTGCATC | 172 |
| STb - R | GGGCGCCAAAGCATGCTCC | |



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR để phát hiện gen *stx2e*, *lt-I*, *sta* và *stb*
 H44: đối chứng dương (*lt-I*, *stb*, *stx2e*); Lad: thang chuẩn;
 1, 4, 5, 6 mẫu xét nghiệm

Bảng 1. Tổng số vi khuẩn *E. coli* trong phân và thịt của bò, heo

| Loại mẫu | | Số mẫu | Tổng số <i>E. coli</i> ($\bar{X} \pm SE$) (MPN/g) | Kết quả phát hiện gen độc lực của <i>E. coli</i> |
|----------|----------|--------|---|--|
| Phân | Phân bò | 10 | $9,5 \cdot 10^6 \pm 7,4 \cdot 10^6$ | Không phát hiện |
| | Phân heo | 10 | $102 \cdot 10^6 \pm 46,3 \cdot 10^6$ | Không phát hiện |
| Thịt | Thịt bò | 8 | $14,8 \cdot 10^4 \pm 4,2 \cdot 10^4$ | Không phát hiện |
| | Thịt heo | 23 | $0,4 \cdot 10^4 \pm 1,1 \cdot 10^4$ | Không phát hiện |

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tổng số vi khuẩn *E. coli* và kết quả phát hiện các gen độc lực của *E. coli* phân lập được từ phân và thịt bò, heo bằng qui trình định lượng

Kết quả xác định tổng số *E. coli* của 10 mẫu phân bò bình thường, 10 mẫu phân heo bình thường, 8 mẫu thịt bò và 23 mẫu thịt heo theo qui trình định lượng được trình bày ở bảng 1.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy *E. coli* trong phân bò tương đối thấp hơn phân heo, thịt bò cao hơn thịt heo. TCVN 7046 – 2002 qui định *E. coli* trên 1 gam thịt tươi không quá 100 vi khuẩn, như vậy 8 mẫu thịt bò đều không đạt, 6/23 mẫu thịt heo đạt tiêu chuẩn (26,1%).

Tổng số *E. coli* trung bình trên 1 gam thịt heo tương đối thấp hơn trên thịt bò mặc dù *E. coli* trung bình trên 1 gam phân heo cao hơn trên phân bò. Điều này có thể do sự khác nhau trong cách giết mổ, vận chuyển và bày bán. Bò được giết mổ thủ công, không sử dụng nước trong quá trình hạ thịt, được pha lọc tại lò mổ và vận chuyển đến chợ lẻ bằng các phương tiện thô sơ. Trong khi giết mổ heo, quày thịt được rửa sạch bằng nước, vận chuyển đến chợ lẻ rồi mới pha lọc, ngoài ra người bán thịt cũng thường cạo sạch bề mặt thịt trước khi pha lọc, do đó thịt heo ít vấy nhiễm hơn.

Mặc dù số lượng *E. coli* trong các mẫu phân bò, heo rất cao, kể cả *E. coli* trên thịt bò, heo. Tuy nhiên trong 51 mẫu *E. coli* phân lập được từ phân và thịt theo qui trình định lượng đều không phát hiện được gen độc lực bằng kỹ thuật multiplex - PCR.

Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng ở nhiệt độ cao ($\geq 44^\circ\text{C}$) những dòng *E. coli* gây bệnh phát triển yếu dần, trong khi *E. coli* cộng sinh (flora) phát triển nhanh hơn. Hill và Carlisle còn ghi nhận rằng nếu tăng sinh trong môi trường ở $44,5^\circ\text{C}$ có thể làm mất plasmid mã hóa những yếu tố độc lực và làm giảm số lượng những dòng *E. coli* gây bệnh có trong thực phẩm (dẫn liệu của Doyle và Padhye, 1989). Như vậy tăng sinh theo qui trình của FAO (1992) không thích hợp cho việc phát hiện các gen độc lực của những dòng *E. coli* gây bệnh.

Từ những lý do trên, chúng tôi cho rằng ưu điểm của phương pháp định lượng là xác định được tổng số vi khuẩn *E. coli* nhưng không bao gồm những dòng *E. coli* mang gen độc lực, đặc biệt là nhóm STEC mà tiêu biểu là O157:H7 tác nhân gây ngộ độc thực phẩm được quan tâm hàng đầu. Do vậy, tổng số *E. coli* xác định được bằng qui trình định lượng chỉ phản ánh mức độ ô nhiễm phân vào thực phẩm nhưng không thích hợp cho việc phát hiện các gen độc lực.

Kết quả phát hiện một số gen độc lực *stx2e*, *sta*, *stb*, *lt-I*, *stx1*, *stx2*, *eae*, và *hlyA*

Tổng số 161 mẫu khảo sát gồm 10 phân bê tiêu chảy, 22 phân heo con tiêu chảy, 21 phân bò bình thường, 25 phân heo bình thường, 34 bề mặt thịt bò, và 49 bề mặt thịt heo. Đối với mẫu phân, ria trực tiếp trên thạch MAC, nuôi cấy ở 37°C . Mẫu thịt được cấy chuyển từ môi trường lỏng CVP qua thạch CT-SMAC. Mục tiêu của khảo sát này là tầm soát sự hiện diện của vi khuẩn *E. coli* mang gen độc lực. Do vậy, chúng tôi không tiến hành PCR cho từng khuẩn lạc riêng lẻ mà chọn 4-10 khuẩn lạc điển hình *E. coli* đại diện cho mẫu rồi chuyển vào cùng một eppendorf để tách chiết DNA. Quy trình m-PCR1 để phát hiện gen *stx2e*, *sta*, *stb*, *lt-I* và qui trình m-PCR2 để phát hiện gen *stx1*, *stx2*, *eae*, và *hlyA*. Kết quả PCR được ghi nhận ở bảng 2.

Gen độc lực của *E. coli* phân lập được từ phân bê tiêu chảy và phân bò bình thường

Kết quả ở bảng 2 cho thấy tỉ lệ mẫu phân bê tiêu chảy có *E. coli* mang gen độc lực *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly*, và *stb* được phát hiện lần lượt là 40%, 20%, 30%, 30% và 20%. Không phát hiện được gen *stx2e*, *sta* và *lt-I*. Như vậy có 7/10 (70%) mẫu phân mang một trong tám gen độc lực, hầu hết chúng thuộc nhóm STEC (5/10 mẫu), chỉ có 2/10 mẫu mang gen sản sinh độc tố ruột chịu nhiệt (ETEC).

Trong 21 mẫu phân bò bình thường, có 13 mẫu (61,9%) phát hiện được một trong tám gen độc lực của *E. coli*, trong đó có 12/21 (57,1%) mẫu mang các gen thuộc nhóm STEC và 4/21 (19,0%) mẫu mang gen sản sinh độc tố chịu nhiệt thuộc nhóm ETEC. Gen *stx2* và *stx1* được phát hiện với tỉ lệ cao nhất (42,9% và 38,1%), kể đến là các gen *hly*

Bảng 2. Kết quả phát hiện gen độc lực *stx2e*, *sta*, *stb*, *lt-I*, *stx1*, *stx2*, *eae*, và *hlyA*

| Mẫu | Số mẫu | Số mẫu có gen độc lực | | | Gen độc lực | | | | | | | |
|----------------------------|-----------|-----------------------|--------------|--------------|--------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | STEC | ETEC | Chung | m-PCR1 | | | m-PCR2 | | | | |
| | | | | | <i>stx2e</i> | <i>sta</i> | <i>stb</i> | <i>lt-I</i> | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>eae</i> | <i>hlyA</i> |
| Phân bê tiêu chảy | 10 | 5 | 2 | 7 | 0 | 0 | 2 | 0 | 4 | 2 | 3 | 3 |
| | | 50,0% | 20,0% | 70,0% | 0 | 0 | 20,0 | | 40,0 | 20,0 | 30,0 | 30,0 |
| Phân bò bình thường | 21 | 12 | 4 | 13 | 0 | 1 | 3 | 0 | 8 | 9 | 1 | 4 |
| | | 57,1% | 19,0% | 61,9% | 0 | 4,8 | 14,3 | | 38,1 | 42,9 | 4,8 | 19,0 |
| Bề mặt thịt bò | 34 | 19 | 1 | 21 | 3 | 0 | 1 | 0 | 11 | 17 | 8 | 9 |
| | | 55,9% | 2,9% | 61,8% | 8,8 | 0 | 2,9 | | 32,4 | 50,0 | 23,5 | 26,5 |
| Tổng cộng | 65 | 36 | 7 | 41 | 3 | 1 | 6 | 0 | 23 | 28 | 12 | 16 |
| | | 55,4 | 10,8 | 63,1 | 4,6 | 1,5 | 9,2 | | 35,4 | 43,1 | 18,5 | 24,6 |
| Phân heo con tiêu chảy | 06 | 2 | 3 | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | | 33,3% | 50,0% | 50,0% | 33,3 | 0 | 33,3 | 0 | 33,3 | 0 | 0 | 0 |
| Phân heo cai sữa tiêu chảy | 16 | 10 | 13 | 14 | 5 | 4 | 13 | 0 | 0 | 8 | 2 | 1 |
| | | 62,5% | 81,3% | 87,5% | 31,3 | 25,0 | 81,3 | 0 | 0 | 50,0 | 12,5 | 6,3 |
| Phân heo bình thường | 25 | 5 | 7 | 10 | 4 | 0 | 7 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 |
| | | 20% | 28% | 40,0% | 16,0 | | 28,0 | 0 | 0 | 4,0 | 8,0 | 8,0 |
| Bề mặt thịt heo | 49 | 12 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 2 | 2 |
| | | 24,5% | 0% | 24,5% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 22,5 | 4,1 | 4,1 |
| Tổng cộng | 96 | 29 | 23 | 39 | 11 | 4 | 23 | 0 | 0 | 22 | 6 | 5 |
| cộng | | 30,2% | 23,9% | 40,6% | 11,5 | 4,2 | 24,0 | 0 | 0 | 22,9 | 6,3 | 5,2 |

và *stb* (19,0% và 14,3%), thấp nhất là các gen *eae*, *sta* (4,8%), chưa phát hiện được gen *lt-I*.

Gen độc lực của *E. coli* phân lập được từ phân heo con tiêu chảy/phân bình thường

Tỉ lệ mẫu phân heo cai sữa tiêu chảy có *E. coli* mang gen độc lực *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly*, *stx2e*, *sta* và *stb* lần lượt là 0%; 50%; 12,5%; 6,3%; 31,3%; 25%; và 81,3%. Có 14/16 (87,5%) mẫu mang một trong tám gen độc lực, trong đó có 10/16 mẫu (62,5%) mang gen sản sinh độc tố shiga (STEC) và 13/16 mẫu (81,3%) mang gen sinh độc tố ruột chịu nhiệt (ETEC).

Trong khi đó, phân heo con tiêu chảy chỉ phát hiện được gen *stx1*, *stx2e* và *stb* với tỉ lệ bằng nhau 33,3%.

Đối với phân heo bình thường, trong 25 mẫu có 10 mẫu mang ít nhất một trong tám gen độc lực (chiếm 40%), trong đó có 5/25 mẫu (20%) mang gen sản sinh độc tố Shiga (STEC) và 7/25 mẫu (28,0%) mang gen sinh độc tố ruột chịu nhiệt (ETEC). Gen *stb* được phát hiện với tỉ lệ cao nhất (28%), kế đến là gen *stx2e* (16%) và gen *eae*, *hly* và *stx2* lần lượt là 8%, 8% và 4%. Chưa phát hiện được gen *stx1*, *sta* và *lt-I*.

Gen độc lực của *E. coli* phân lập được từ bề mặt thịt bò và heo

Để tăng khả năng phát triển của nhóm *E. coli* mang gen độc lực STEC (Shiga toxin *E. coli*) trên thịt, chúng tôi sử dụng môi trường MAC bổ sung thêm đường sorbitol, kháng sinh cefixime và tellurite. Trên CT-SMAC, *E. coli* O₁₅₇H₇, và khoảng 6% các serotype non-O₁₅₇H₇ của STEC tạo khuẩn lạc không màu hoặc màu xám với tâm đục, các *E. coli* khác cho khuẩn lạc màu hồng giống như trên MAC.

Trên thịt bò, 21/34 (61,8%) mẫu nhiễm *E. coli* mang gen độc lực. Tần số phát hiện được gen *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly* và *stb* lần lượt là 32,4% ; 50% ; 23,5% ; 26,5% và 2,9%, chưa phát hiện được gen *sta* và *lt-1* (Bảng 2). Gen *stx2e* gây bệnh phù thũng trên heo cai sữa được phát hiện trong 3 mẫu thịt bò, có thể do sự nhiễm phân heo thịt mang trùng trong quá trình hạ thịt.

Tương tự, 12/49 (24,5%) mẫu thịt heo nhiễm *E. coli* mang gen độc lực. Phát hiện được 11/49 (22,5%) mẫu mang gen *stx2*, 2/49 (4,1%) mẫu mang gen *eae* và *hly*, không phát hiện được gen *stx1* và các gen của nhóm ETEC. Tóm lại *E. coli* mang gen độc lực phát hiện được trên thịt heo thấp hơn thịt bò (24,5% so với 61,8%).

THẢO LUẬN

Kết quả khảo sát cho thấy tỉ lệ mẫu phân có *E. coli* mang gen sản sinh độc tố Shiga (STEC) ở phân bò bình thường và phân bê tiêu chảy lần lượt là

57,1% và 50%. Trong khi đó, có 20% mẫu phân heo bình thường mang gen sản sinh độc tố Shiga. Ngược lại, trong phân heo cai sữa tiêu chảy, tỉ lệ này là 62,5%. Ngoài ra, *E. coli* mang gen độc lực phát hiện được trên thịt heo thấp hơn thịt bò (24,5% so với 61,8%). Như vậy STEC hiện diện khá phổ biến trong phân bò bình thường, phân bê tiêu chảy, phân heo cai sữa tiêu chảy và trên thịt bò giết mổ thủ công hoặc xuất hiện không thường xuyên trong phân heo bình thường và trên thịt heo. Kết quả của chúng tôi tương tự như nhận định của Beutin và ctv (1995). Họ đã cho rằng những dòng STEC tồn tại trong phân bình thường của thú nuôi khỏe mạnh, nhất là trong phân thú thuộc loài nhai lại. Người tiêu dùng cảm nhiễm STEC do ăn phải thức ăn bị nhiễm hoặc tiếp xúc trực tiếp với STEC từ động vật. Người nhiễm STEC có thể tiêu chảy hoặc trầm trọng hơn thì viêm kết tràng xuất huyết (HC) hoặc hội chứng huyết niệu (HUS) đe dọa đến tính mạng của người và động vật (Karmali, 1989); trẻ em có thể tử vong do tiêu chảy và tổn thương thận cấp (Nataro và Kaper, 1998).

Do đó, vệ sinh tốt cho thú hạ thịt, vệ sinh trong lúc hạ thịt và phân phối là biện pháp hàng đầu ngăn ngừa vấy nhiễm STEC từ phân đến thịt nhằm đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm cho người tiêu dùng.

Gen *stx2e* chịu trách nhiệm sản sinh độc tố vero chỉ được phát hiện ở *E. coli* trong phân heo con theo mẹ tiêu chảy (33%), phân heo cai sữa tiêu chảy (31,3%) và phân heo bình thường (16%). Điều này phù hợp với kết luận của Beutin và ctv (1993), *stx2e* là một biến chủng của *stx2*, biến chủng này chỉ hiện diện ở *E. coli* trong phân heo. Kết quả khảo sát này cho thấy trong phân heo bình thường vẫn hiện diện các dòng *E. coli* sinh độc tố vero gây bệnh tiêu chảy và phù thũng cho heo con, đặc biệt là trên heo sau cai sữa. Do đó, vệ sinh tốt tại chuồng nuôi heo con, quản lý “cùng vào, cùng ra” và quản lý dinh dưỡng hợp lý là biện pháp phòng ngừa tiêu chảy và phù thũng cho heo con.

Ngoài ra, các gen sinh độc tố ruột của *E. coli* thuộc nhóm ETEC, đặc biệt là gen *stb* hiện diện khá phổ biến trong *E. coli* ở phân heo cai sữa tiêu chảy (81,3%), phân heo con theo mẹ tiêu chảy (33,3%), trong phân bò và heo bình thường thì tỉ lệ này thấp hơn. Theo Blanco và ctv (1997), gen *stb* xuất hiện với tỉ lệ cao nhất 78,4% (58/74 mẫu) so với các gen độc lực khác của *E. coli* phân lập từ phân heo con tiêu chảy. Ông kết luận rằng độc tố STb góp phần đáng kể trong hội chứng tiêu chảy ở heo. Nhận định này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Handl và ctv (1992), Harel và ctv (1991).

KẾT LUẬN

Tổng số *E. coli* được xác định bằng qui trình định lượng chỉ phản ánh mức độ ô nhiễm phân của thực phẩm nhưng không thích hợp cho việc phát hiện các gen độc lực của nhóm STEC và ETEC.

Trong tám gen độc lực của *E. coli* trong các loại mẫu phân tích, *stx1* hiện diện nhiều nhất trong phân bò bình thường, phân bê tiêu chảy và trên thịt bò giết mổ thủ công; gen *stx2* hiện diện nhiều trong phân bò bình thường, phân heo con tiêu chảy, trên thịt bò giết mổ thủ công và hiện diện ở mức trung bình trên thịt heo; gen *stb* và *stx2e* hiện diện nhiều trong phân heo cai sữa tiêu chảy. Gen *hly* hiện diện ở mức trung bình trong phân bò, bê tiêu chảy và thịt bò nhưng khá thấp trong phân heo và thịt heo. Như vậy, phân bò và bê có thể là nguồn lưu trữ chính của STEC.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Beutin L., Geier D., Steinruck H., Zimmermann S., and Scheutz F., 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga – like toxin) – producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* 31:2483 – 2488.

Beutin L., Geier D., Zimmermann S., and Karch H., 1995. Virulence markers of Shiga - like toxin producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of difference species. *J. Clin. Microbiol.* 33:631–635.

Blanco M., Blanco J.E, Gonzales E.A., Mora A., Jasen W., Gomes T.A.T., Zerbini L.F., Yano T., de Castro A.F.P., and Blanco J., 1997. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: Relationship with phenotype. *J. Clin. Microbiol.* 35:2958-2963.

Doyle M.P. and Padhye V.V., 1989. *Escherichia coli*. In *Foodborne bacterial pathogens* (Ed: M.P. Doyle). Marcel Decker Inc. NY. pp235-281.

FAO, 1992. *Microbiological analysis in the food control laboratory*.

Handl C.E., Olsson E., and Flock J.I., 1992. Evaluation of three different STb assays and comparison of enterotoxin pattern over a five-year period in Swedish porcine *Escherichia coli*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 15:505-510.

Harel J., Lapointe H., Fallara A., Lorrtie A., Bigras-Poulin M., Lariviere S., and Fairbrother J.M., 1991. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli*

serogroups isolated from pig with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 29:745-752

Karmali M. A., 1989. Infection by verocytotoxin – producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol. Rev.* 2:15–38.

Nataro J. P., and Kaper J. B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Reviews.* 11:142–201.

Nguyen Ngoc Hai, 2002. Maladie de l'edemede porc au Vietnam: caractérisation des souches *Escherichia coli* responsables, facteurs de pathogénicité et vaccination. PhD Thesis. Université de Toulouse, France.

Paton A. W. and Paton J. C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex – PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *Escherichia coli hlyA*, *rfb* O111, and *rfb* O157. *J. Clin. Microbiol.* 36:598–602.