

**PHÂN TÍCH MỘT SỐ GEN BIẾN THỂ CỦA ĐỘC TỐ SHIGA CỦA VI  
KHUẨN *Escherichia coli* O157: H7 PHÂN LẬP TỪ TRÂU BÒ KHỎE MẠNH  
TẠI MỘT SỐ TỈNH NAM TRUNG BỘ**

*Bùi Thị Ba<sup>1</sup>, Đào Hoài Thu<sup>2</sup>, Đỗ Văn Tấn<sup>2</sup>,  
Hoàng Huy Hòa<sup>2</sup> và Vũ Khắc Hùng<sup>2</sup>*

**TÓM TẮT**

Nghiên cứu nhằm xác định một số biến thể của gen độc tố Shiga (*stx1*, *stx1c*, *stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2g*) của 34 chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 phân lập từ trâu, bò khỏe mạnh tại một số tỉnh Nam Trung bộ. Kết quả cho thấy có 27 chủng (79,41%) mang gen của độc tố Stx1 và 29 chủng (85,35%) mang gen của độc tố Stx2, trong đó có 22 chủng (64,71%) mang đồng thời cả hai gen của độc tố Stx1 và Stx2. Trong số 27 chủng mang gen của độc tố Stx1 có 18 chủng (66,67%) mang gen *stx1c* và 9 chủng (33,33%) mang gen *stx1*. Trong 29 chủng mang gen của độc tố Stx2, 5 chủng (14,71%) là gen *stx2c*, 9 chủng (31,03%) thuộc gen *stx2d*, 15 chủng (55,72%) biến thể mang gen *stx2* và 3 chủng (6,90%) mang gen *stx2g*.

*Từ khóa:* *E. coli* O157:H7, *stx1*, *stx1c*, *stx2c*, *stx2d*, biến thể, trâu bò.

**Analysis on genetic variation of Shiga toxin gene in *E. coli*  
O157:H7 strain isolated from healthy cattle and buffaloes  
in some provinces in Central Vietnam**

*Bùi Thị Ba, Đào Hoài Thu, Đỗ Văn Tấn,  
Hoàng Huy Hòa, Vũ Khắc Hùng*

**SUMMARY**

We determined the prevalence of variant genes of Shiga toxin gene (*stx1*, *stx1c*, *stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2g*) of 34 *E. coli* O157:H7 strains which were isolated from healthy cattle and buffaloes in some provinces in the central region of Vietnam. The results showed that 27/34 strains (79,41%) carried genes for Stx1 toxin, 29/34 strains (85,35%) carried genes for Stx2 and 22/34 strains (64,71%) carried both of two genes for Stx1 and Stx2 toxin. Further, characterization of Stx subtypes demonstrated that among 27 strains carried genes for Stx1, 18 strains (66,67%) carried *stx1c* gene and 9 strains (33,33%) carried *stx1*. Of the 29 strains carried genes for Stx2, 5 strains (14,71%) carried variant gene *stx2c*, 9 strains (31,03%) carried variant gene *stx2d*, 15 strains (55,72%) were *stx2* and 3 strains (6,90%) carried *stx2g* gene.

*Key words:* *E. coli* O157:H7, *stx1c*, *stx2c*, *stx2d*, variant, cattle.

**I. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Vi khuẩn *Escherichia coli* sản sinh độc tố Shiga (STEC: Shiga toxin-producing *E. coli*) hay còn gọi là độc tố Vero (Vero toxin-producing *E. coli*) là nguyên nhân gây ra một số bệnh nguy hiểm cho con người như: hội chứng urê huyết (HUS: hemolytic uremic syndrome), hội chứng viêm kết tràng xuất huyết (HC: hemorrhagic). [Friedrich AW và cs (2002); Zheng H và cs (2005); Prager R và cs (2009)]. Nhóm STEC gây bệnh cho người phụ thuộc vào khả năng sản sinh độc tố Shiga. Độc tố Shiga bao gồm 2 nhóm chính: Shiga toxin 1 (Stx1) và Shiga toxin 2 (Stx2). Hiện nay, nhóm Stx1 gồm 3 loại biến thể là Stx1, Stx1c và Stx1d. Nhóm Shiga toxin 2 bao gồm rất nhiều loại biến thể trong đó các loại biến thể thường gặp là Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g. Trong số các loại biến thể trên Stx2e thường phân lập được từ lợn, Stx2f phân lập từ chim và Stx2g phân

lập trên bò nhưng phổ biến trên động vật nhai lại [Tyler SD và cs (1991); Osawa R và cs (2000); Zhang W và cs (2002); Leung PH và cs (2003); Zheng H và cs (2005); Kawano K và cs (2008)].

Nhóm STEC có nhiều serotype khác nhau, trong đó serotype gây bệnh nguy hiểm cho người là O157:H7. Bệnh do *E.coli* O157: H7 được phát hiện lần đầu tiên trong một vụ ngộ độc thực phẩm do ăn bánh hamburger chế biến từ thịt bò tại Hoa Kỳ vào năm 1982 (Riley LW và cs, 1983). Cho đến nay bệnh do *E. coli* O157:H7 gây ra vẫn đang phổ biến ở các nước phát triển như Anh, Mỹ, Nhật và ở các nước đang phát triển khác với số người mắc bệnh ngày một tăng. Động vật nhai lại được xem là vật mang và phát tán vi khuẩn này ra môi trường xung quanh [Baker DR và cs (2007); Wang H và cs (2008); Williams AP và cs (2008)].

Việt Nam là một nước nông nghiệp, tập quán chăn nuôi còn lạc hậu, người chăn nuôi hàng ngày phải tiếp xúc trực tiếp với gia súc, điều này đã làm tăng nguy cơ mắc bệnh. Để đánh giá khả năng gây bệnh cho người của các chủng *E.coli* O157:H7 chúng tôi tiến hành xác định các loại biến thể của độc tố Shiga trên vi khuẩn này.

## II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung nghiên cứu

Xác định một số gen biến thể của độc tố Shiga gồm *stx1* (*stx1c*), *stx2* (*stx2c*, *stx2d*, *stx2* và *stx2g*) của vi khuẩn *E.coli* O157:H7 phân lập trên trâu bò khỏe mạnh.

### 2.2. Nguyên liệu

- Các chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7 có khả năng sản sinh độc tố Shiga phân lập từ trâu, bò khỏe mạnh ở một số tỉnh Nam Trung Bộ.
- Các chủng đối chứng dương về một số biến thể của độc tố Shiga: EDL 933 ( *stx1*, *stx2*, *ehxA*), 97-24(*stx2*), EDL 242 (*stx2c*), TW02883 (*stx2d*), 3115/97 (*stx1c*, *stx2d*), 65 (*stx2g*) do Tiến sĩ Nancy A. Cornick, khoa Y tế dự phòng và Vi sinh vật thú y, trường Đại học Thú Y bang Iowa, Hoa kỳ cung cấp.
- Các loại hóa chất, sinh phẩm dùng trong phản ứng PCR.
- Các enzyme cắt giới hạn PvuII và HaeIII do hãng New England BioLabs Inc cung cấp.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Chiết tách ADN: ADN của vi khuẩn được chiết tách bằng phương pháp sốc nhiệt: Lấy 200ml canh khuẩn *E.coli* O157:H7 ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút, trong 3 phút ở nhiệt độ 4°C; hút bỏ dịch nổi, hoàn nguyên cặn bằng nước siêu sạch (nước cất 2 lần, hấp tiệt trùng) sau đó mang đun cách thủy ở 100°C/ 10 phút; đặt ngay vào ngăn đá -20°C/ 5 phút làm sốc nhiệt để phá vỡ tế bào; ly tâm 4000 vòng/ phút trong 4 phút; thu nước nổi có chứa ADN của tế bào vi khuẩn, bảo quản ADN ở -20°C.

- Xác định các biến thể của độc tố Shiga bằng phương pháp PCR và PCR-RELP (PCR-restriction fragment length polymorphism): Xác định biến thể của độc tố *Stx1c* bằng phản ứng PCR như mô tả bởi Zhang W và cs (2002). Xác định và phân biệt các gen biến thể *stx2c*, *stx2d*, *stx2* bằng phương pháp PCR-RFLP của Piérard P và cs (1998). Xác định gen biến thể *stx2g* bằng phương pháp PCR của Leung PH và cs (2003).

**Bảng 1: Các cặp môi và kích thước gen dùng trong nghiên cứu**

| Môi     | Trình tự môi (5' – 3') | Gen kiểm tra | Kích thước (bp) | Tác giả nghiên cứu   |
|---------|------------------------|--------------|-----------------|----------------------|
| Stx1c-F | TTTTCACATGTTACCTTTCCT  | <i>stx1c</i> | 498             | Zhang W và cs (2002) |
| Stx1c-R | CATAGAAGGAACTCATTAGG   |              |                 |                      |

|         |                        |                                                 |     |                           |
|---------|------------------------|-------------------------------------------------|-----|---------------------------|
| VT2-e   | AATACATTATGGGAAAGTGCGG | <i>stx2</i> ,<br><i>stx2c</i> ,<br><i>stx2d</i> | 348 | Piérard D và cs<br>(1998) |
| VT2-f   | TAAACTGCACTTCAGCAAAT   |                                                 |     |                           |
| Stx2g-F | GTTATATTTGTGGATATC     | <i>stx2g</i>                                    | 573 | Leung PH và cs<br>(2003)  |
| Stx2g-R | GAATAACCGCTACAGTA      |                                                 |     |                           |

**Bảng 2: Kích thước các đoạn gen sau khi phân cắt bằng enzyme giới hạn**

| Cặp mồi | Enzyme giới hạn | Kích thước của các đoạn gen biến thể của độc tố Stx2 |          |             |              |              |
|---------|-----------------|------------------------------------------------------|----------|-------------|--------------|--------------|
|         |                 | Stx2                                                 | VTx2c    |             | VTx2d        |              |
|         |                 |                                                      | VTx2vh-a | VTx2vh-b    | VTx2d-Ount   | VTx2d-OX3a   |
| VTx2-e  | HaeIII          | 348                                                  | 216, 132 | 216, 132    | 216, 132     | 167, 132, 49 |
| VTx2-f  | PvuII           | 323, 25                                              | 323, 23  | 250, 73, 25 | 200, 120, 28 | 200, 120, 28 |

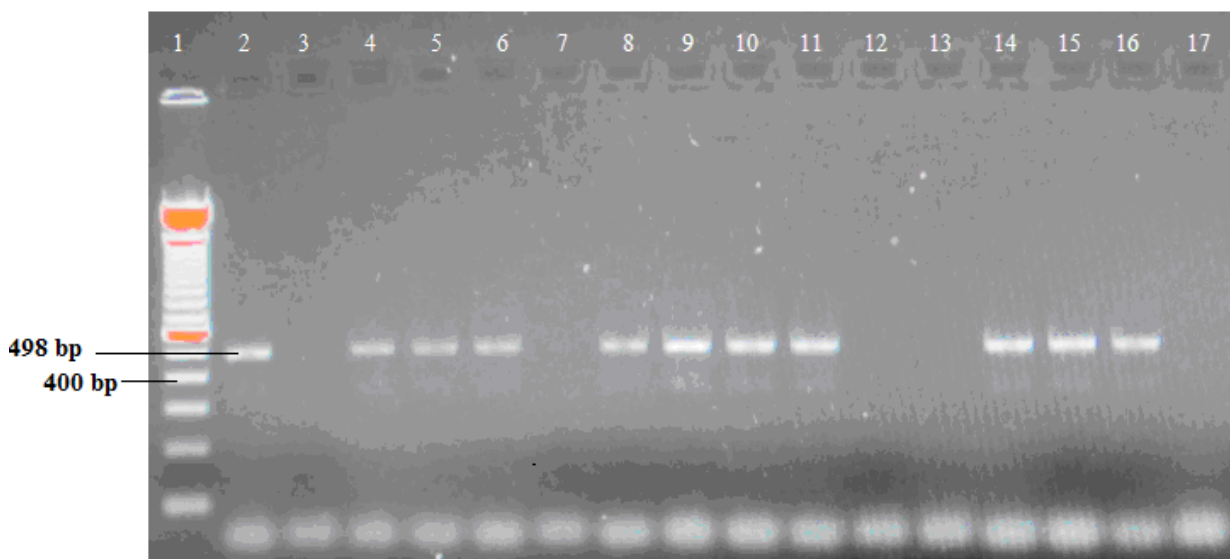
### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành xác định một số độc tố Shiga trên 34 chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 có khả năng sản sinh độc tố Shiga đó được phân lập tại một số tỉnh Nam Trung Bộ. Trong số 34 chủng *E. coli* O157:H7 có 27 chủng (79,41%) mang gen của độc tố Stx1 và 29 chủng (85,35%) mang gen của độc tố Stx2, trong đó có 22 chủng (64,71%) mang cả hai gen của độc tố Stx1 và Stx2. Gần đây Aspán A và cs (2010) khi phân tích 111 chủng *E. coli* O 157:H7 phân lập trên bò khỏe mạnh tại Thụy Điển từ năm 1998 đến 2002 nhận thấy tỷ lệ các chủng *E. coli* O157:H7 mang gen *stx1* là 39% (44/111) thấp hơn nhiều so với kết quả của chúng tôi.

**Bảng 3: Các gen biến thể của độc tố Stx1 và Stx2 của *E. coli* O157:H7**

| Gen          | Số lượng | Tỷ lệ (%) |
|--------------|----------|-----------|
| <i>stx1</i>  | 9        | 33,33     |
| <i>stx1c</i> | 18       | 66,67     |
| <i>stx2</i>  | 16       | 55,17     |
| <i>stx2c</i> | 4        | 11,76     |
| <i>stx2d</i> | 9        | 31,03     |
| <i>stx2g</i> | 2        | 6,90      |

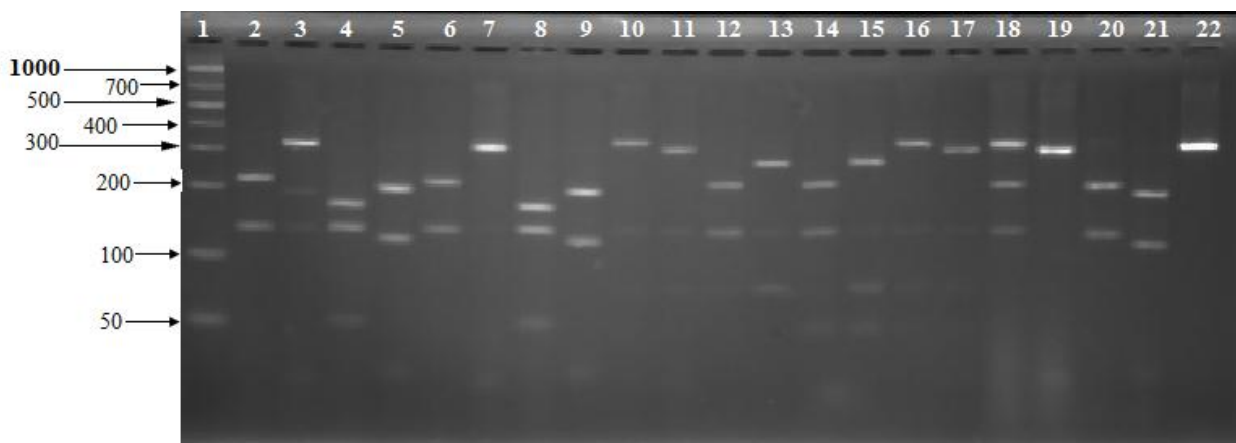
Trong số 27 chủng mang gen của độc tố Stx1 có 18 chủng (66,67%) mang gen *stx1c* và 9 chủng (33,33%) mang gen *stx1*. Các kết quả nghiên cứu trước đây (Brett KN và cs, 2003) cho rằng biến thể Stx1c trên các chủng STEC chủ yếu được phân lập từ cừu (chiếm 65,7% các chủng STEC phân lập từ cừu), hiếm khi tìm thấy trên trâu, bò. Kết quả nghiên cứu này một lần nữa khẳng định rằng không chỉ có dê, cừu là vật mang các chủng *E. coli* sản xuất độc tố Shiga mà trâu bò cũng là vật mang các chủng này.



**Hình 1: Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định gen *stx1c***

Đối với các chủng dương tính với gen của độc tố Stx2 được khuếch đại với cặp mồi VT2-e và VT2-f, sau đó sử dụng enzyme giới hạn HaeIII và PvuII phân cắt để phân biệt ba loại biến thể của nó là Stx2, Stx2c và Stx2d. Kết quả cho thấy, trong 29 chủng mang gen của độc tố Stx2, 5 chủng (14,71%) mang gen biến thể của độc tố Stx2c, 9 chủng (31,03%) mang gen biến thể của độc tố Stx2d và 15 chủng (51,72%) thuộc biến thể Stx2. Tỷ lệ các chủng mang gen *stx2c* trong nghiên cứu này thấp hơn nhiều so với kết quả nghiên cứu của Ding H và cs (2011), tại Trung Quốc các tác giả này đã phân lập được 12/27 (44%) chủng *E.coli* O157:H7 mang gen sản sinh độc tố Stx2c phân lập từ trâu, bò; Trong một nghiên cứu khác, tỷ lệ này cũng thấp hơn so với gen *stx2c* của cả nhóm STEC ở khu vực (20/76).

Trong nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy tỷ lệ các chủng *E. coli* O157:H7 mang gen *stx2d* là tương đối cao 15/34 (51,72%). Theo các kết quả nghiên cứu trước đây [Piérard D và cs (1998); Stephan R và cs (2000); Zheng H và cs (2005); Kawano K và cs (2008)] cho thấy các chủng *E. coli* sản xuất độc tố Shiga gây hội chứng niệu huyết rất ít khi là biến thể Stx2d. Điều này chứng tỏ rằng các chủng *E. coli* O157:H7 sản xuất độc tố Stx2d ít khi gây bệnh cho người.

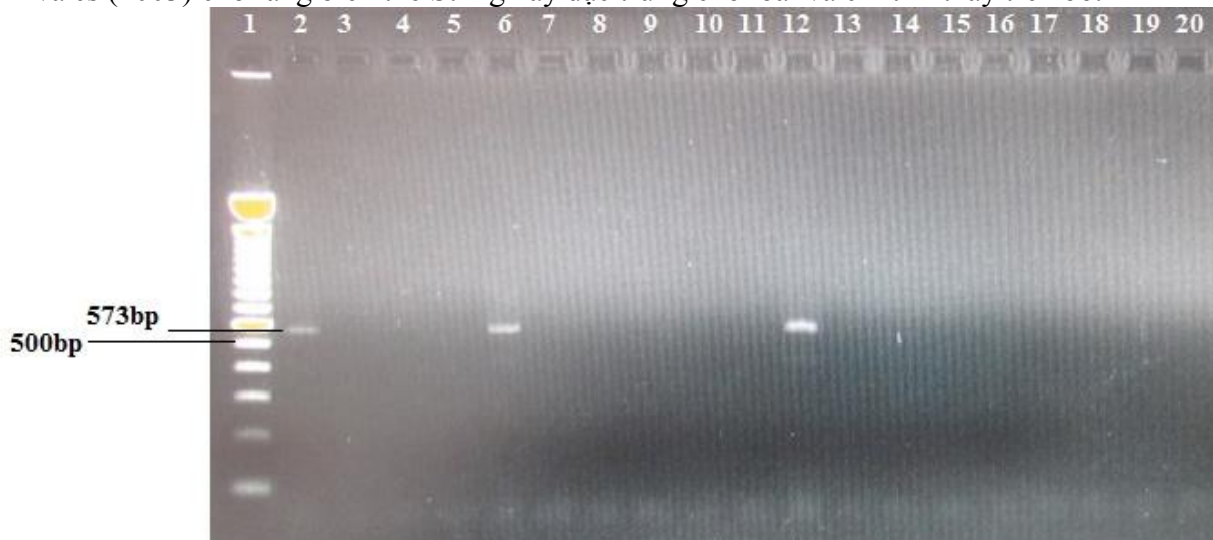


**Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR- LFRP xác định gen *stx2c*, *stx2d*, *stx2***

|                         |             |                                  |          |
|-------------------------|-------------|----------------------------------|----------|
| 1. Marker: 50-1000bp    |             | 12. 139H: 216, 132               | VTx2hv-a |
| 2. 3H: 216, 132         | VTx2hv-a    | 13. 139P: 250, 75, 25            |          |
| 3. 3P: 323 25           |             | 14. 234H: 216, 132               | VTx2hv-a |
| 4. 4H: 197, 132, 49     | VTx2d- OX3a | 15. 234P: 250, 75, 25            |          |
| 5. 4P: 200, 120, (28)*  |             | 16. 235 H: 384                   | VTx2     |
| 6. 23H: 126,132         | VTx2hv-a    | 17. 235 P: 323 (25)*             |          |
| 7. 23P: 325, (23)       |             | 18. 7H: 216, 132                 | VTx2hv-a |
| 8. 139H: 167, 132, 49   | VTx2d- OX3a | 19. 7H: 323, (25)                |          |
| 9. 139P: 200, 120 (28)* |             | 20. B2F1H: 216, 132              | VTx2d-   |
| OX3a                    |             | 21. B2F1P: 200,120,(28)          |          |
| 10. 76H: 384            | VTx2        | 22. Sản phẩm PCR không có enzyme | giới hạn |
| 11. 76P: 323 (25)*      |             |                                  |          |

Ghi chú: H = enzyme giới hạn *HaeIII*, P: enzyme giới hạn *PvuII*, chủng *E. coli* (Stx2c) và B2F1 (Stx2d) là đối chứng dương.

Leung PH và cs, 2003 cho rằng biến thể Stx2g chủ yếu được phân lập từ nhóm STEC phân lập trên bò, trong kết quả này chúng tôi nhận thấy tỷ lệ các chủng mang gen *stx2g* là 6,90% (2/29 chủng). Kết quả này tương đương với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Trọng Hải và cs (2011). Như vậy, kết quả này một lần nữa khẳng định cho nhận xét của Leung PH và cs (2003) cho rằng biến thể Stx2g này đặc trưng cho loài và chỉ tìm thấy trên bò.



**Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định gen biến thể *stx2g***

Các kết quả trước đây [Piérard D và cs (1998); Osawa R và cs (2000); Friedrich AW và cs (2000); Baker DR và cs (2007); Ding H và cs (2011)] cho thấy biến thể Stx2 và Stx2c của độc tố Shiga có khả năng gây bệnh urê huyết, niệu huyết, tiêu chảy ra máu... Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy phần lớn các chủng *E. coli* O157:H7 phân lập từ trâu bò khỏe mạnh có khả năng sản xuất độc tố Shiga biến thể Stx1 và Stx2c. Điều này chứng tỏ rằng đa số các chủng *E. coli* O157:H7 đều có khả năng gây bệnh cho người.

#### IV. KẾT LUẬN

*Escherichia coli* O157:H7 phân lập trên trâu, bò khỏe mạnh ở một số tỉnh Nam Trung bộ mang các gen biến thể của độc tố Shiga Stx1 và Stx2.

Trong số 27 chủng mang gen của độc tố Stx1 có 18 chủng (66,67%) mang gen *stx1c* và 9 chủng (33,33%) mang gen *stx1*.

Trong 29 chủng mang gen của độc tố Stx2, 5 chủng (14,71%) là mang gen *stx2c*, 9 chủng (31,03%) mang gen *stx2d*, 15 chủng (55,72%) là *stx2* và *stx2g* chiếm 2 chủng (6,90%).

*E.coli* O157:H7 là serotype thường mang gen *stx2*, *stx2c* gây hội chứng HUS và HC nguy hiểm cho người như được mô tả ở các nước khác.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baker DR, Moxley RA, Steele MB, LeJeune JT, Christopher-Hennings J, Chen DG, Hardwidge PR, Francis DH (2007). Differences in virulence among *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from humans during disease outbreaks and from healthy cattle. *Appl Environ Microbiol.* 73(22): 7338-7346.
2. Brett KN, Ramachandran V, Hornitzky MA, Bettelheim KA, Walker MJ, Djordjevic SP, 2003. Stx1c is the most common Shiga Toxin 1 subtype among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep but not among isolates from cattle. *J Clin Microbiol*, 41: 926-936.
3. Ding H, Huang L, Mao X, Zou Q, 2011. Characterization of *stx2* and its variants in *Escherichia coli* O157:H7 isolated from patients and animals, *AJB*, 10: 2991-2998.
4. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H, 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis.* 185: 74-84.
5. Kawano K, Okada M, Haga T, Maeda K, Goto Y, 2008. Relationship between pathogenicity for humans and *stx* genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 27: 227-232.
6. Leung PH, Peiris JS, Ng WW, Robins-Browne RM, Bettelheim KA, Yam WC, 2003. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 69(12):7549-7553.
7. Nguyễn Trọng Hải, Đào Hoài Thu, Phan Thị Hằng, Hồ Văn Hiệp, Nguyễn Thị Kim Phụng, Đỗ Văn Tấn, Lê Đình Hải, Vũ Khắc Hùng, 2011. Xác định tỷ lệ nhiễm và khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn *E.coli* O157:H7 trên trâu, bò khỏe mạnh ở một số tỉnh Nam Trung bộ, *Khoa học Kỹ thuật thú y tập XVIII*, số 3, 31- 37.
8. Tyler SD, Johnson WM, Lior H, Wang G, Rozee KR, 1991. Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 29(7): 1339-1343.
9. Vu-Khac H, Cornick NA, 2007. Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle and goat in central Viet Nam, *Vet Microbiol.* 126(4):356-363.
10. Wang H, Mao X, Ding H, Zou Q, Peng X, 2008. Epidemiological survey on *Escherichia coli* O157 in Chongqing and Three-Gorge reservoir areas of China. *Vet Res Commun.* 32(6): 449-461.

