

MỐI LIÊN QUAN CỦA TUỔI, GIỐNG BÒ, TÌNH TRẠNG TIÊU CHẢY VÀ MÙA VỤ ĐẾN TỶ LỆ PHÁT HIỆN GEN ĐỘC LỰC CỦA VI KHUẨN *E. COLI*

Bùi Thị Thu Trang và Nguyễn Ngọc Tuấn

Đại học nông lâm TPHCM

TÓM TẮT

Tổng số 238 mẫu phân bò được thu thập từ các trại chăn nuôi tại TP Hồ Chí Minh (50 mẫu phân bê tiêu chảy, 65 phân bê bình thường, 69 phân bò tiêu chảy, và 54 phân bò bình thường). Nuôi cấy và phân lập *E. coli* trên môi trường CT-SMAC bổ sung 0,05mg/L kháng sinh cefixime và 2,5mg/L tellurite. Mỗi mẫu chọn 4-5 khuẩn lạc trắng và/hay hồng để cấy chuyển vào từng ống NA riêng biệt, ủ 37⁰C/24h, thử IMViC. Xác định các gen *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly* bằng mPCR1 (Paton và Paton, 1998) và gen *rfbE*, *fliC* của O157:H7 bằng mPCR2 (McEvoy, 2003) cho DNA *E. coli* trong mỗi mẫu phân cũng như của từng gốc *E. coli*.

Trong 238 mẫu phân đã phát hiện được 90 mẫu có *E. coli* mang gen độc lực (37,82%), trong đó gen *stx2* chiếm 18,49%, kể đến là gen *stx1* 13,03%, *eae* và *hly* được phát hiện với tỉ lệ như nhau 12,61%, gen *rfbE* và *fliC* hiện diện với tỉ lệ thấp lần lượt là 0,84% và 2,94%.

Trắc nghiệm χ^2 cho thấy từng yếu tố khảo sát liên quan rõ rệt đến tỉ lệ phát hiện gen *stx2* của STEC ($p < 0.05$) nhưng yếu tố tuổi không liên quan đến khả năng phát hiện gen *stx1* và yếu tố mùa cũng không liên quan đến gen *hly* ($p > 0.05$); tỉ lệ phát hiện gen *eae* liên quan rõ rệt đến yếu tố tuổi và giống bò ($p < 0.05$). Phân tích hồi quy logit của 4 yếu tố kết hợp ta thấy *E. coli* trong phân tiêu chảy cho cơ hội phát hiện gen *stx1*, *stx2* và *hly* của STEC cao hơn 2 lần so với phân bình thường; phân bò sữa Holstein có tỉ lệ phát hiện gen *stx1*, *stx2* cao hơn 9 lần và gen *eae* gấp 13 lần so với giống bò Ta; mùa mưa giúp phát hiện gen *stx2* cao gấp 4 lần so với mùa nắng nhưng không liên quan đến tỉ lệ phát hiện các gen độc lực khác. Tuổi bò không liên quan đến khả năng phát hiện gen *stx1* và *stx2* nhưng tăng khả năng phát hiện gen *eae* trong phân bò trưởng thành gấp 6 lần và gen *hly* gấp 3 lần so với phân bê. Tỉ lệ phát hiện gen *rfbE* và *fliC* của *E. coli* O157:H7 trong phân không khác biệt giữa các yếu tố khảo sát.

Từ khóa: Bò, *E. coli*, STEC, O157:H7, Gen độc lực, Tần suất phát hiện

The relationship of the age, breed of cattle, condition of diarrhea and season to the frequency of detection of virulent genes of *E. coli*

Bùi Thị Thu Trang, Nguyễn Ngọc Tuấn

SUMMARY

A total of 238 fecal samples were collected from cattle farms at Ho Chi Minh city for culturing and confirming *E. coli*, then using mPCR to detect virulent genes. Frequency of *stx2* gene was 18.49%, *stx1* gene was 13.03%, *eae* and *hly* genes were 12.61%; *rfbE* and *fliC* genes were 0.84% and 2.94% respectively.

The results of χ^2 test was indicated that the age, condition of diarrhea, breed of cattle, and season related to the frequency of *stx2* genes detection of the STEC group but the age did not to *stx1* gene, the condition of diarrhea and season did not to *eae* gene, and the season did not also to *hly* gene. However, logistic test showed that the frequency of *stx1*, *stx2* and *hly* genes detection of the STEC in diarrhea feces were double higher than normal case; *stx1*, *stx2* and *eae* genes in Holstein breed were 9 to 13 fold than Ta breed, and *stx2* gene in the rain season was 4 fold than the dry season but the season did not related to other genes. The age did not related to *stx1* and *stx2* genes detection of the STEC but *eae* gene in adult cattle was 6 fold and *hly* gen was 3 fold than in calf. Specially, *rfbE* and *fliC* genes detection of *E. coli* O157:H7 did not related to four factors ($P > 0.05$).

Key words: Cattle, *E. coli*, STEC, O157:H7, Virulent genes. Detection frequency

I. GIỚI THIỆU

Escherichia coli là thành viên thường trực của hệ vi khuẩn đường ruột người và nhiều loài hữu nhũ khác, hầu hết chúng vô hại cho vật chủ. *E. coli* có khả năng gây bệnh chỉ chiếm một tỉ lệ nhỏ trong quần thể này và tùy theo cách sinh bệnh trên đường ruột mà người ta chia chúng thành các nhóm EPEC, STEC, ETEC, EAEC, EIEC, DAEC. Trong đó nhóm STEC (Shiga like Toxin Producing *E. coli*), nhất là serotyp O157:H7 được đặc biệt quan tâm.

Nhóm STEC mang nhiều gen độc lực mã hóa độc tố Shiga, độc tố gây xuất huyết ruột (enterohaemolysin) Chúng là nguyên nhân của nhiều vụ ngộ độc thực phẩm, với các hội chứng lâm sàng như viêm đường dạ dày – ruột, gây tiêu chảy, gây viêm kết tràng xuất huyết (hemorrhagic colitis):

HC); nhiễm trùng đường niệu (urinary tract infection), gây hội chứng huyết niệu (hemolytic uraemic syndrome: HUS), viêm màng não (Nakasone và ctv, 2005). O157:H7 là một trong những tác nhân quan trọng gây tử vong cho trẻ em ở những nước đang phát triển (Morin và ctv, 2004). Chính vì vậy, việc phát hiện gen độc lực *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly* của STEC và xác định serotyp O157:H7 được thực hiện. Mục tiêu của bài báo là phân tích một số yếu tố liên quan đến tỉ lệ phát hiện gen độc lực *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly* của STEC; và gen *rfbE*, *fliC* của serotyp O157:H7 bằng kỹ thuật multiplex-PCR.

II. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Lấy mẫu

Mẫu phân được lấy bằng cách dùng tăm bông vô trùng ngoáy vào phân vừa mới thải ra hoặc ngoáy vào hậu môn của bò, bê nuôi tại một số nông hộ và trại chăn nuôi ở TP Hồ Chí Minh. Mẫu được cho vào ống chứa 10 mL môi trường peptone đậm (CVP) có bổ sung kháng sinh cefixime (0,0125mg/L) và vancomycin (8mg/L) (FDA, 2002). Tổng số mẫu thu thập được là 238, gồm 50 phân bê tiêu chảy, 65 phân bê bình thường, 69 phân bò tiêu chảy, và 54 phân bò bình thường.

2.2 Nuôi cấy phân lập vi khuẩn và ly trích DNA

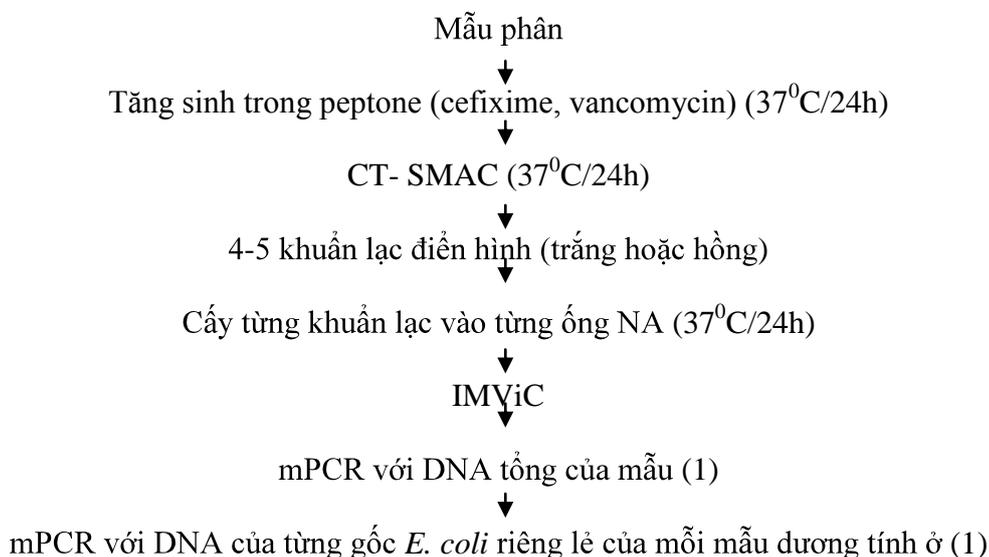
Tất cả các ống canh chứa mẫu (CVP) được lắc đều trước khi ủ $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$. Sau đó cấy chuyển sang môi trường CT-SMAC và ủ $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$. CT-SMAC là môi trường sorbitol MacConkey agar (Merck), được bổ sung 0,05mg/L kháng sinh cefixime và 2,5mg/L tellurite. Mục đích sử dụng môi trường này là để tăng sinh và phân lập nhóm STEC, đặc biệt là O157:H7.

Đối với mỗi mẫu, trên thạch CT-SMAC, 4-5 khuẩn lạc trắng và/hay hồng (ngghi ngờ là *E. coli*) được chọn cấy chuyển vào các ống NA riêng biệt, ủ $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$, sau đó kiểm tra phản ứng IMViC. Các gốc *E. coli* của cùng một mẫu phân cho kết quả IMViC dương tính được gom chung vào một eppendorf chứa 200 μL nước cất (khử ion 2 lần) để tiến hành ly trích bằng phương pháp nhiệt (Cebula và ctv, 1995; Botteldoorn và ctv, 2003).

2.3 Xác định gen độc lực *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly* của STEC, gen *rfbE*, *fliC* của O157:H7 bằng multiplex-PCR (mPCR)

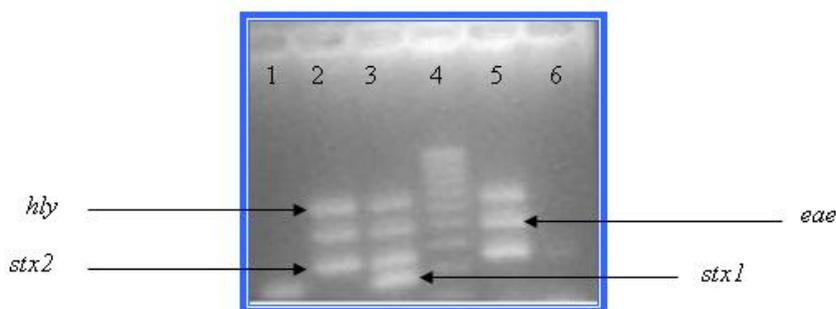
Phát hiện các gen độc lực của *E. coli* trong mỗi mẫu phân được thực hiện qua 2 bước: (i) xác định các gen *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly* của nhóm STEC bằng mPCR1 (Paton và Paton, 1998) và gen *rfbE*, *fliC* của O157:H7 bằng mPCR2 (McEvoy, 2003) được thực hiện với DNA hỗn hợp của tất cả các gốc *E. coli* phân lập được từ mỗi mẫu phân; (ii) các mẫu cho kết quả dương tính (với bất kỳ gen độc lực nào), các phản ứng mPCR được thực hiện lặp lại với DNA của từng gốc *E. coli* riêng lẻ của mẫu đó (Sơ đồ 1). *E. coli* chủng EDL933 được cung cấp bởi bộ môn Vi sinh – Truyền nhiễm, trường Thú y Toulouse (Pháp), được dùng làm đối chứng dương.

Mục đích của bước (i) là để sàng lọc những mẫu có DNA hỗn hợp âm tính. Việc loại bỏ những mẫu âm tính ở bước (i) trước khi tiến hành bước (ii) sẽ góp phần tiết kiệm thời gian, công sức, và kinh phí so với việc không thực hiện bước (i).

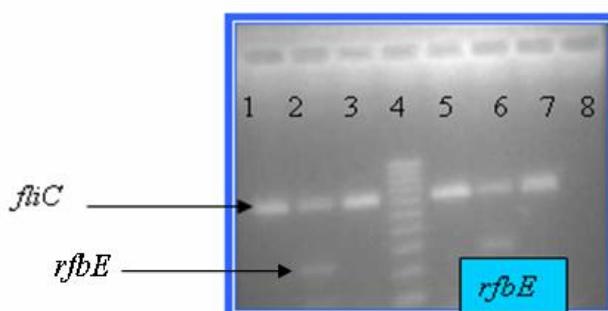


Sơ đồ 1. Phân lập *E. coli* từ mẫu phân và phát hiện gen độc lực

Để kiểm tra kết quả mPCR, mẫu được điện di trên gel agarose 1,5% trong TBE 0,5X. Kết quả được đọc bằng máy chụp gel với phần mềm Quality One 2000 (Bio-Rad) (Hình 1, Hình 2).



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm mPCR1 (giếng 1, 2, 5, 6: mẫu xét nghiệm; 3: *E. coli* EDL933; 4: thang chuẩn 100bp)



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm mPCR2 (giếng 1, 3, 5, 6, 7, 8: mẫu xét nghiệm; 2: *E. coli* EDL933; 4: thang chuẩn)

Xử lý số liệu

Các phần mềm SPSS 15.0 và ngôn ngữ R 2.8.0 được sử dụng để phân tích từng yếu tố liên quan đến tỷ lệ phát hiện gen bằng trắc nghiệm χ^2 hoặc đa yếu tố bằng phương pháp logistic (yếu tố tuổi, tiêu chảy, giống bò và mùa).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phát hiện các gen *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly*, *rfbE*, *fliC*

Trong số 238 mẫu phân thu thập, các gen độc lực được phát hiện từ các gốc *E. coli* phân lập được trong 90 mẫu (chiếm 37,82%), trong đó gen *stx2* hiện diện với tỉ lệ cao nhất 18,49%, kế đến là gen *stx1* 13,03%, *eae* và *hly* được phát hiện với tỉ lệ như nhau 12,61%, nhưng gen *rfbE* và *fliC* hiện diện với tỉ lệ thấp lần lượt là 0,84% và 2,94%.

Trắc nghiệm χ^2 cho thấy yếu tố tiêu chảy, giống bò và mùa có liên quan đến tỉ lệ phát hiện gen *stx1* của STEC ($p < 0,05$). Tương tự, gen *stx2* bị ảnh hưởng bởi 4 yếu tố (tuổi, tiêu chảy, giống bò và mùa) ($p < 0,05$); tuổi và giống bò liên quan đến tỉ lệ phát hiện gen *eae*; gen *hly* không liên quan đến yếu tố mùa ($p > 0,05$).

Bảng 1. Kết quả phát hiện gen độc lực *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly*, *rfbE*, *fliC*

Gen	Tuổi		Tiêu chảy		Giống bò		Mùa		n %
	Bê (n)	Bò (n)	Có	Không	Ta	Sữa	Nắng	Mưa	
	115	123	119	119	85	153	86	152	
<i>stx1</i>	15	16	21	10	2	29	16	15	31
%	13,04 ^a	13,01 ^a	17,65 ^b	8,40 ^b	2,35 ^c	18,95 ^d	18,60 ^e	9,87 ^e	13,03
<i>stx2</i>	13	31	30	14	4	40	8	36	44
%	11,30 ^a	25,20 ^b	25,21 ^c	11,76 ^d	4,71 ^e	26,14 ^f	9,30 ^g	23,68 ^h	18,49
<i>eae</i>	6	24	20	10	2	28	8	22	30
%	5,22 ^a	19,51 ^b	16,81 ^c	8,40 ^c	2,35 ^d	18,30 ^e	9,30 ^f	14,47 ^f	12,61
<i>hly</i>	7	23	22	8	0	30	9	21	30
%	6,09 ^a	18,70 ^b	18,49 ^c	6,72 ^d	0 ^e	19,61 ^f	10,47 ^g	13,82 ^g	12,61
<i>rfbE</i>	0	2	0	2	0	2	0	2	2
%	0	1,63	0	1,68	0	1,31	0	1,32	0,84
<i>fliC</i>	1	6	5	2	0	7	1	6	7
%	0,87	4,88	4,20	1,68	0	4,60	1,16	3,95	2,94
Có gen	36	54	60	30	7	83	32	58	90
%	31,30	43,90	50,42	25,21	8,24	54,25	37,21	38,16	37,82
N									238

Ghi chú: Bê (từ sơ sinh đến 6 tháng tuổi), bò (từ 6 tháng tuổi trở lên)

Gen độc lực *stx1*

Để xem xét mối quan hệ giữa các yếu tố tuổi (bê, bò), tình trạng (tiêu chảy, bình thường), giống (bò ta, bò sữa), và mùa (nắng, mưa) với tỉ lệ phát hiện gen độc lực *stx1*, kết quả phân tích được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Mô hình logit về khả năng phát hiện gen *stx1*

$logit = - 4,2533 + 0,884 \text{ Tiêu chảy} + 2,295 \text{ Giống bò}$				
Tiêu chảy	OR = 2,42	95% CI (1,06 – 5,51)	Pz = 0,035	G = 21,315 > χ^2 P = 0,000
Giống bò	OR = 9,92	95% CI (2,29 – 42,93)	Pz = 0,002	

Bảng 2 cho thấy tiêu chảy và giống bò tương quan thuận với tỉ lệ phát hiện gen *stx1*, trong khi trắc nghiệm χ^2 chỉ cho biết giống bò ảnh hưởng đến tỉ lệ phát hiện gen độc lực *stx1* mà thôi (Bảng 1). Như vậy mô hình logit cho biết rằng phân tiêu chảy cho cơ hội phát hiện gen *stx1* cao gấp 2,42 lần so với mẫu phân bình thường (OR = 2,42); bò sữa cho tỉ lệ phát hiện gen *stx1* cao gấp 9,92 lần so với bò ta (OR = 9,92). Tuy nhiên yếu tố tuổi bò (bò / bê) và mùa lại không liên quan đến khả năng phát hiện gen *stx1*.

Gen độc lực *stx2*

Bảng 3. Mô hình logit về việc phát hiện gen *stx2*

$logit = - 6,0342 + 0,8141 \text{ Tiêu chảy} + 2,2187 \text{ Giống bò} + 1,3985 \text{ MÙA}$				
Tiêu chảy	OR = 2,26	95% CI (1,07 – 4,74)	Pz = 0,032	G = 39,393 > χ^2 P = 0,0001
Giống bò	OR = 9,20	95% CI (3,09 – 27,33)	Pz = 0,000	
Mùa	OR = 4,05	95% CI (1,72 – 9,53)	Pz = 0,001	

Mô hình ở Bảng 3 rất có ý nghĩa (ở P = 0,0001). Điều này diễn tả mối tương quan thuận giữa tỉ lệ phát hiện gen *stx2* với tình trạng tiêu chảy, giống bò và mùa, với Pz lần lượt là (0,032, 0,000, và 0,001). Như vậy, so với kết quả ghi nhận được từ trắc nghiệm χ^2 (Bảng 1) cho thấy yếu tố tuổi bò đã được loại ra khỏi mô hình, không còn liên quan đến tỉ lệ phát hiện gen *stx2* nữa. Trong 3 yếu tố liên quan, yếu tố tiêu chảy có OR = 2,26, nghĩa là phân tiêu chảy sẽ cho cơ hội phát hiện gen *stx2* cao gấp 2,26 lần so với phân bình thường. Khả năng phát hiện gen *stx2* trên phân của bò sữa cao gấp 9,20 lần so với phân của bò ta (OR = 9,20). Yếu tố mùa có OR = 4,05 nghĩa là mùa mưa làm tăng tỉ lệ phát hiện gen *stx2* lên gấp

4,05 lần so với mùa nắng.

Gen độc lực *eae*

Bảng 4. Mô hình logit về việc phát hiện gen *eae*

$logit = - 5,1985 + 1,8482 \text{ Tuổi} + 2,6026 \text{ Giống bò}$				
Tuổi	OR = 6,35	95% CI (2,42 – 16,63)	Pz = 0,000	G = 33,224 > χ^2 P = 0,000
Giống bò	OR = 13,50	95% CI (3,06 – 59,49)	Pz = 0,001	

Mô hình ở bảng 4 cho thấy tuổi có mối quan hệ thuận với tỷ lệ phát hiện gen *eae* của vi khuẩn *E. coli* (OR = 6,35, P = 0,000); giống bò có mối quan hệ thuận với tỉ lệ phát hiện gen *eae* của *E. coli* (OR = 13,50, P = 0,001). Trong trường hợp này, phương pháp logistic đã cho nhận định tương tự như với phương pháp sử dụng trắc nghiệm χ^2 .

Gen độc lực *hly*

Cũng từ Bảng 5, mô hình chỉ ra mối quan hệ thuận của tuổi với tỉ lệ phát hiện gen *hly* (OR = 3,22); trong khi tiêu chảy lại có mối quan hệ thuận với tần số phát hiện gen *hly* (OR = 2,83). Mô hình này cũng thực sự rất có ý nghĩa (P = 0,001). Và so với trắc nghiệm χ^2 , phương pháp logistic đã giúp loại bỏ yếu tố giống bò ra khỏi mô hình mô tả mối quan hệ.

Bảng 5. Mô hình logit về việc phát hiện gen *hly*

$logit = - 3,3066 + 1,1702 \text{ Tuổi} + 1,0415 \text{ Tiêu chảy}$				
Tuổi	OR = 3,22	95% CI (1,31 – 7,92)	Pz = 0,011	G = 15,134 > χ^2 P = 0,001
Tiêu chảy	OR = 2,83	95% CI (1,19 – 6,74)	Pz = 0,018	

Gen *rfbE*, và *fliC*

Xử lý số liệu thống kê cho thấy tỉ lệ phát hiện gen *rfbE* và *fliC* của *E. coli* không có sự khác biệt giữa các yếu tố (tuổi, tình trạng, giống và mùa) (P>0,05). Cho nên, phần phân tích hồi quy logistic không được tiến hành.

Như vậy, thông qua phương pháp logistic, tỉ lệ phát hiện từng gen độc lực (*stx1*, *stx2*, *eae*, *hly*, *rfbE*, *fliC*) đã được thiết lập mối quan hệ với các yếu tố khảo sát. Kết quả phân tích có phần giống nhau, cũng có phần khác nhau so với trắc nghiệm χ^2 . Do vậy, nếu có điều kiện nên phân tích đồng thời các yếu tố khảo sát để có thể đảm bảo tính chặt chẽ của kết quả thu thập, góp phần tìm kiếm được bản chất của một vấn đề khoa học, nhất là trong việc khảo sát môi liên quan.

3.2 Thảo luận một số yếu tố liên quan đến tỷ lệ phát hiện gen độc lực của *E. coli*

Như đã nhận định, tỉ lệ phát hiện gen độc lực đều có liên quan ít nhất một trong bốn yếu tố (tuổi, tình trạng tiêu chảy, giống bò, và mùa).

Gen *rfbE*, và *fliC*

Xử lý số liệu thống kê cho thấy tỉ lệ phát hiện gen *rfbE* và *fliC* của *E. coli* không có sự khác biệt giữa các yếu tố (tuổi, tình trạng, giống và mùa) (P>0,05). Cho nên, phần phân tích hồi quy logistic không được tiến hành.

Như vậy, thông qua phương pháp logistic, tỉ lệ phát hiện từng gen độc lực (*stx1*, *stx2*, *eae*, *hly*, *rfbE*, *fliC*) đã được thiết lập mối quan hệ với các yếu tố khảo sát. Kết quả phân tích có phần giống nhau, cũng có phần khác nhau so với trắc nghiệm χ^2 . Do vậy, nếu có điều kiện nên phân tích đồng thời các yếu tố khảo sát để có thể đảm bảo tính chặt chẽ của kết quả thu thập, góp phần tìm kiếm được bản chất của một vấn đề khoa học, nhất là trong việc khảo sát môi liên quan.

3.2.1 Tuổi (bê, bò)

Kết quả khảo sát này cho thấy tỷ lệ phát hiện gen độc lực của nhóm STEC trong phân bò cao hơn bê (Bảng 1). Thật vậy, phân bò là nguồn chứa STEC (Bach và ctv, 2002). Năm 2002, Yilmaz và ctv báo cáo STEC, đặc biệt là O157:H7 thường được phân lập trên bò khoảng 2 năm tuổi trở lên. Không phát hiện được các gen *stx* ở những dòng *E. coli* được phân lập từ phân bê mới sinh, nhưng tỉ lệ phát hiện các gen này tăng dần trong phân bê trưởng thành hơn (trích dẫn bởi Rasmussen và Casey, 2001). Byrne và ctv (2003) cũng thông báo rằng những dòng STEC hiện diện với tỉ lệ cao trong phân bò. Sở dĩ bò có khả năng bài thải STEC nhiều hơn bê là do bò thường được nuôi bằng khẩu phần nhiều ngũ cốc hơn so với bê. Trong ngũ cốc, các loại bột bắp thường làm cho quá trình lên men kéo dài từ dạ cỏ đến ruột già, đây là điều kiện thuận lợi để các dòng O157:H7 tồn tại và phát triển (Buchko và ctv, 2000).

Stanford và ctv (2005) kết luận rằng những bò đang trong giai đoạn cho sữa có nguy cơ bài thải O157:H7 nhiều hơn so với những bò khô sữa.

Trái lại, nhiều tác giả cho rằng STEC và serotyp O157:H7 xuất hiện ở bê nhiều hơn ở bò trưởng thành (Hancock và ctv, 1998). Buchko và ctv (2000) cũng có cùng nhận định rằng bê sau cai sữa và bê thịt 1 năm tuổi thường bài thải O157:H7 cao hơn bò trưởng thành.

3.2.2 Tình trạng tiêu chảy

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy phân tiêu chảy cho tỉ lệ phát hiện gen độc lực nhóm STEC cao hơn so với phân không tiêu chảy. Tuy nhiên trong thực tế, ít có công trình so sánh tỉ lệ phát hiện gen độc lực của STEC trong phân có hay không có biểu hiện tiêu chảy. Đa phần các tác giả đều đưa ra kết luận về mối liên quan giữa gen độc lực của STEC với tình trạng tiêu chảy ở người hoặc bò. Law (2000) báo cáo tình trạng tiêu chảy và hội chứng HUS xảy ra trên người trong các vụ ngộ độc thực phẩm có liên quan đến những dòng STEC được phân lập từ bò. Cooley và ctv (2007) cho rằng O157:H7 mang gen độc lực *stx* thường kết hợp với tiêu chảy trên người do ngộ độc thực phẩm. STEC là nguyên nhân của nhiều ca tiêu chảy trên bò và người (Beutin và Strauch, 2007). Theo Wieler (2009), tiêu chảy xuất hiện nhiều vào mùa mưa, nguyên nhân có thể do mùa mưa thức ăn thường ẩm và xấu hơn, vi khuẩn ít bị tiêu diệt bởi ánh nắng mặt trời, mùa mưa làm tăng độ ẩm trong môi trường nên vi khuẩn dễ dàng phát triển, phát tán và gây ô nhiễm hơn mùa nắng. Như vậy, kết quả ghi nhận được về mặt phân tích thống kê trong đề tài này đã góp phần làm sáng tỏ thêm mối liên quan giữa tỉ lệ phát hiện gen độc lực với tình trạng tiêu chảy của bê, bò.

3.2.3 Giống (bò sữa, bò ta)

Giống cũng là một yếu tố quan trọng có liên quan đến tỉ lệ phát hiện gen độc lực nhóm STEC. Thực vậy, theo nhận định của Yilmaz và ctv (2002), STEC và O157:H7 có thể được phân lập từ phân của nhiều giống bò khác nhau, nhưng hiện diện nhiều nhất là trên bò sữa Holstein và giống Swiss Brown. Yilmaz và ctv (2002) còn cho biết thêm là bò đực sẽ cho tỉ lệ phát hiện gen độc lực nhiều hơn trên bò cái. Gen độc lực *stx* thường được phát hiện trên bò sữa (Wilson và ctv, 1996), điều này phù hợp với kết quả phân tích của chúng tôi. Vì bò sữa nhiễm nhiều serotyp *E. coli* thuộc nhóm STEC mang gen độc lực, nếu quy trình vệ sinh kém sẽ dễ vấy nhiễm vào sữa và các sản phẩm từ sữa, trở thành mối nguy cho người tiêu dùng sữa và liên quan đến nhiều vụ ngộ độc thực phẩm (Yoon và Hovde, 2008). Hancock và ctv (1998), Fitzgerald và ctv (2003) cũng kết luận tỉ lệ O157:H7 hiện diện cao trên bò sữa. Tuy nhiên, tại Canada và Hà Lan, người ta nhận thấy O157:H7 thường tồn tại với tỉ lệ cao trên bò thịt (Donkersgoed và ctv, 1999). Faith và ctv (1996) đã ghi nhận sự tồn tại của O157:H7 (khoảng 2,8%) trên phân của bò thịt và bò sữa. O157:H7 còn có thể được phân lập từ các loại thịt bò, heo, dê, cừu, và gia cầm, nhưng nhiều nhất là trên thịt bò bán lẻ tại các chợ (Samadpour và ctv, 1994). Nói chung, giống là một yếu tố liên quan chặt chẽ đến tỉ lệ phát hiện gen độc lực của *E. coli* nhóm STEC. Bên cạnh yếu tố giống, còn nhiều yếu tố khác liên quan đến tỉ lệ phát triển của STEC trong phân như mật độ thú, sự chuyên đàn, phương pháp vệ sinh kém, môi trường ẩm độ cao, lầy lội, dơ bẩn (Stanford và ctv, 2005). Và trong đề tài này, bò sữa cho tỉ lệ phát hiện gen độc lực cao hơn bò ta.

3.2.4 Mùa (nắng, mưa)

Phương pháp phân tích logistic cho thấy tỉ lệ phát hiện từng gen độc lực có thể phụ thuộc vào tuổi, hoặc tình trạng tiêu chảy, hoặc giống bò, hoặc tùy thuộc vào sự kết hợp giữa ba yếu tố này. Riêng đối với yếu tố mùa, duy nhất tỉ lệ phát hiện gen *stx2* là có liên quan và được phát hiện với tỉ lệ cao vào mùa mưa so với mùa khô.

Theo Jay (2000), yếu tố mùa liên quan đến sự xuất hiện của những trận dịch do *E. coli* nhóm STEC gây ra. Ông cho biết các trận dịch này thường xảy ra trong những tháng hè nóng ẩm, và tăng cao vào tháng 7, 8, 9; do vậy tỉ lệ phát hiện gen độc lực cũng tăng cao vào giai đoạn này. Tương tự, tại Mỹ, từ năm 1982 – 2002, khoảng 89% dịch do STEC (đặc biệt là O157:H7) thường xảy ra vào giai đoạn tháng 5 – 11 (Rangel và ctv, 2005). CDC (2002) một lần nữa khẳng định mùa hè là mùa của những trận dịch STEC, O157:H7 xảy ra. Theo Rasmussen và Casey (2001), O157:H7 tăng cao vào những tháng hè và thu, thỉnh thoảng xuất hiện vào mùa xuân ở Canada; tác giả này cũng thảo luận rằng các yếu tố môi trường, cách cho bò ăn có thể ảnh hưởng đến mức độ bài thải O157:H7 ở bò. Ferens và ctv (2004) cho rằng trong suốt mùa hè và những tháng đầu thu là thời gian mà các ca bệnh do STEC, O157:H7 tăng

cao; và người bệnh thường là trẻ em, người cao tuổi, những người giảm sức đề kháng với tác nhân gây bệnh. Tương tự, có rất nhiều công trình nhận định những tháng hè và đầu mùa thu là khoảng thời gian mà nhóm STEC và serotyp O157:H7 nổi ra rầm rộ hơn (Elder và ctv, 2000; Acheson và ctv, 2000); tại các thời điểm khác O157:H7 cũng xuất hiện nhưng với tỉ lệ rất thấp vào những tháng mùa đông.

Tuy nhiên, ở Ba Lan, người ta nhận thấy rằng tháng 12 và tháng 1 là những tháng O157:H7 thường xảy ra nhất (Doyle và ctv, 2001). Ở Anh, tỷ lệ tầm soát O157:H7 thường cao vào mùa xuân (khoảng 38%), trong khi vào mùa đông vi khuẩn này chỉ hiện diện khoảng hơn 4%, và người ta cho rằng sự ấm lên của mùa xuân đã làm gia tăng khả năng phát triển của dòng *E. coli* O157:H7 hơn so với thời tiết lạnh (Chapman và ctv, 1997). Nói chung, mùa vẫn là yếu tố quan trọng góp phần quyết định tỉ lệ phát hiện gen độc lực của STEC.

Như vậy, tần số hiện diện của vi khuẩn *E. coli* nhóm STEC nhiều hay ít, tỉ lệ phát hiện gen độc lực của nhóm STEC cao hay thấp tùy thuộc vào rất nhiều yếu tố khác nhau như tuổi bò, giống bò, tình trạng tiêu chảy, mùa, giới tính, các yếu tố môi trường, điều kiện quản lý của trang trại,... và có thể sẽ thay đổi theo thời gian, vùng địa lý.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

Tỉ lệ phát hiện gen độc lực *stx1* của STEC phụ thuộc vào tình trạng tiêu chảy và giống bò. Sự phát hiện gen *stx2* gắn liền với tình trạng tiêu chảy, giống và mùa. Gen *eae* liên quan với tuổi và giống bò. Tỉ lệ phát hiện gen *hly* liên quan đến tuổi và tình trạng tiêu chảy của bò. Nhìn chung, tỉ lệ phát hiện gen độc lực của *E. coli* trên phân bò luôn cao hơn trên phân bê, trong phân tiêu chảy cao hơn phân bình thường, giống bò sữa cao hơn bò ta, và mùa mưa luôn cao hơn mùa nắng.

Đã phân lập được 2 gốc vi khuẩn *E. coli* có mang gen *rfbE* và *fliC* mã hóa cho kháng nguyên thân O157 và kháng nguyên lông H7.

Đề nghị

Có thể dùng kỹ thuật PCR để phát hiện gen độc lực của *E. coli* nhóm STEC, gen nhận diện O157:H7 trên gia súc, các sản phẩm động vật, nhất là trong các vụ ngộ độc thực phẩm nghi ngờ do *E. coli*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Acheson D., Ngo T., and Chitrakar R., 2000. Prevalence of O157 and non-O157 STEC in the United States., *Proc. 4th Int. Symp. Workshop. In Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Infections*, Kyoto, Japan. p. 107.
2. Beutin L. and Strauch E., 2007. Identification of Sequence Diversity in the *Escherichia coli fliC* Genes Encoding Flagellar Types H8 and H40 and Its Use in Typing of Shiga Toxin-Producing *E. coli* O8, O22, O111, O174, and O179 Strains. *J. Clin. Microbiol.* 45(2): 333–339.
3. Cebula T. A., Payne W. L., and Fegn P., 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga like toxin type by Mismatch amplification mutation assay multiplex – PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 248 – 250.
4. Donkersgoed J. V., Graham T., Gannon V., 1999. The prevalence of verotoxin *Escherichia coli* O157H7, and *Salmonella* in the feces and rumen of cattle at processing. *Can Vet. J.* 40(5): 332–338.
5. Faith N. G., Shere J. A., Brosch R., Arnold K. W., Ansay S. E., Lee M. S., Luchansky J. B., and Kaspar C. W., 1996. Prevalence and clonal nature of *E. coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1519-1525.
6. Ferens W.A., Grauke L. J., Hovde C. J., 2004. Shiga toxin 1 targets bovine leukemia virus-expressing cells. *Infect Immun.* 72: 1837-1840.
7. Hancock D. D., Besser T. E., Rice D. H., Kaper J. B., O'Brien A. D., 1998. In *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Eds J. B. Kaper and A. D. O'Brien (*Am. Soc. Microbiol. Washington, DC*). pp 85–91.
8. Law D., 2000. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology.* 88: 729-745.
9. Nakasone N., Tran H. H., Nguyen M. B., Higa N., Toma C., Song T., Ichinose Y., and Iwanaga M., 2005. Short report: isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from fecal samples of cows in Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73(3): 586–587.

10. Paton A. W., and Paton J. C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assay for *stx₁*, *stx₂*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO₁₁₁*, *rfbO₁₅₇*. *J. Clin. Microbiol.* 36(2):598-602
11. Rangel J. M., Sparling P. H., Crowe C., et al., 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 11(4): 603-609.
12. Wilson J. B., Clarke R. C., Renwick S. A., Rahn K., Johnson R. P., Karmali M. A., Lior H., Alves D., Gyles C. L., Sandhu K. S., McEwen S. A., and Spika J. S., 1996. Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. *J. Infect. Dis.* 174: 1021–1027.
13. Nakasone N., Tran H. H., Nguyen M. B., Higa N., Toma C., Song T., Ichinose Y., and Iwanaga M., 2005. Short report: isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from fecal samples of cows in Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73(3): 586–587.
14. Paton A. W., and Paton J. C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assay for *stx₁*, *stx₂*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO₁₁₁*, *rfbO₁₅₇*. *J. Clin. Microbiol.* 36(2):598-602
15. Wilson J. B., Clarke R. C., Renwick S. A., Rahn K., Johnson R. P., Karmali M. A., Lior H., Alves D., Gyles C. L., Sandhu K. S., McEwen S. A., and Spika J. S., 1996. Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. *J. Infect. Dis.* 174: 1021–1027.