

PHÂN TÍCH MỨC TƯƠNG ĐỒNG GENOME CỦA VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* GÂY BỆNH Ở LỢN CON BẰNG PHƯƠNG PHÁP PFGE

Võ Thành Thìn, Lê Lập, Đặng Văn Tuấn,

Đặng Thanh Hiền, Vũ Khắc Hùng

Phân viện thú y miền Trung

TÓM TẮT

Mức tương đồng genome của 26 chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ lợn con mắc bệnh tiêu chảy hoặc phù đầu tại một số địa phương của Việt Nam đã được xác định bằng phương pháp điện di xung điện trường (Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE). Mức độ tương đồng của các chủng mang kháng nguyên F4 cao hơn và có quan hệ gần hơn so với chủng mang kháng nguyên F18. Phương pháp PFGE có thể ứng dụng để phân tích đặc điểm dịch tễ và lựa chọn chủng vi khuẩn để nghiên cứu sản xuất vacxin phòng bệnh tiêu chảy do *E. coli* gây ra ở lợn.

Từ khóa: Tương đồng genome, Điện di xung điện trường, Vi khuẩn *E. coli*, Lợn con, Tiêu chảy

GENOMIC SIMILARITY ANALYSIS OF *E. COLI* STRAINS CAUSED DISEASE IN PIGLETS BY USING PFGE METHOD

Vo Thanh Thin, Le Lap, Dang Van Tuan,

Dang Thanh Hien, Vu Khac Hung

SUMMARY

Genome similarity level of 26 *E. coli* strains isolated from piglets with diarrhea or edema disease in some regions of Vietnam have been identified by means of PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis). The similarity of the strains carried F4 fimbriae was higher and more closely related than strains bearing F18 fimbriae. The PFGE method might be applicable as a tool to analyze epidemiological characteristics and select strains for studying the vaccine production against diseases caused by *E. coli* in piglets.

Key words: Genome similarity, Pulsed-field gel electrophoresis, *E. coli* strains, Piglets Diarrhea

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cấu trúc kháng nguyên của vi khuẩn *E. coli* gây bệnh trên gia súc rất đa dạng và phức tạp với 4 nhóm kháng nguyên chính là các kháng nguyên O (kháng nguyên thân), H (kháng nguyên lông), K (kháng nguyên giáp mô) và F (kháng nguyên bám dính) (Gyles và Fairbrother, 2010). Sự đa dạng về tính kháng nguyên này gây rất nhiều khó khăn cho công tác phòng chống bệnh trên gia súc. Vì thế, việc đánh giá mức độ tương đồng kháng nguyên giữa các chủng vi khuẩn *E. coli* gây bệnh tại các địa phương là cơ sở cho việc lựa chọn chủng vi khuẩn *E. coli* điển hình, đủ điều kiện để nghiên cứu, sản xuất vacxin phòng bệnh.

Hiện nay, một trong những phương pháp được áp dụng rộng rãi để phân tích mối quan hệ giữa các chủng vi khuẩn là điện di xung điện trường PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis). Bằng phương pháp này, sự tương đồng về genome của các chủng vi khuẩn sẽ được xác định (Blanco và *cs.*, 2006; Lee và *cs.*, 2009). Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào đánh giá về sự tương đồng của các chủng vi khuẩn *E. coli* gây bệnh trên lợn tại các địa phương. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng phương pháp PFGE để đánh giá sự tương đồng về genome của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ lợn con tiêu chảy tại một số địa phương trong cả nước.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên liệu

- 18 chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ lợn con mắc bệnh tiêu hoặc phù đầu chảy tại khu vực Nam trung bộ - Tây Nguyên (Võ Thành Thìn và cs., 2009).

- Chủng vi khuẩn *E. coli* tham chiếu (so sánh): PT56, PT140.2, TB10, HY4, HT, KR, CT, HCM2 được phân lập từ lợn con tại một số tỉnh thuộc miền Bắc và miền Nam, do TS. Đỗ Ngọc Thúy (Viện thú y) và Ths. Nguyễn Thị Kim Oanh (Trung tâm chẩn đoán thú y TW) cung cấp.

- Môi trường, hóa chất thực hiện phản ứng PFGE: NaCl 5M, Tris-HCl 1M (pH 7,2), EDTA 0,5M (pH 8,0), sodium deoxycholate, N-lauroylsarcosine/ sodium salt, lysozyme, proteinase K, đệm TE (Tris-EDTA buffer), đệm TBE (Tris/Borate/EDTA), dung dịch PMSF 1mM, dung dịch BSA/spermidine, enzyme cắt giới hạn *Xba*I.

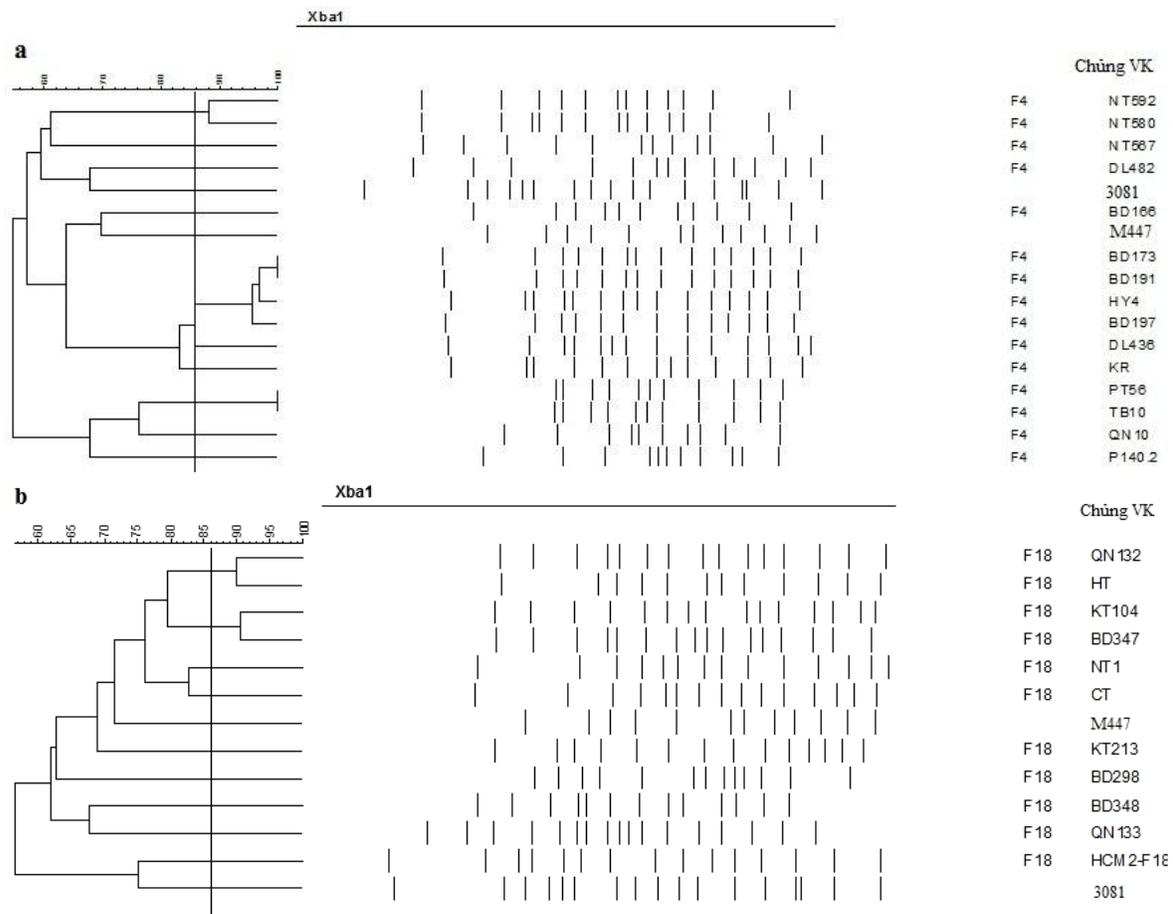
2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Sự tương đồng genome của một số chủng vi khuẩn *E. coli* được xác định bằng phương pháp PFGE tại phòng thí nghiệm của PGS.TS. Nancy Cornick, thuộc Bộ môn Vi sinh vật thú y, khoa Thú y, trường Đại học Bang IOWA (Iowa state University). Quy trình thực hiện phản ứng dựa theo Sambrook và Russell (2001), Helgerson và cs. (2006).

- DNA của vi khuẩn *E. coli* được chiết tách bằng cách cấy chủng vi khuẩn lên môi trường Tryptic soy broth, ủ ấm 37⁰C qua đêm. Xác vi khuẩn sau khi ly tâm, rửa sạch và cố định trên lỗ gel. Lỗ gel có chứa xác vi khuẩn được xử lý với dung dịch ly giải vi khuẩn ở 37⁰C trong 2 giờ (dung dịch ly giải vi khuẩn bao gồm lysozyme (1 mg/ml) pha trong 10 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl, 100 mM EDTA (pH 8,0), 0,2% sodium deoxycholate và 0,5% (wt/vol) N-lauroylsarcosine). Sau đó, tiếp tục xử lý bằng proteinase K, nồng độ 0,5 mg/ml pha trong dung dịch 0,5 mM EDTA (pH 8.0) và 1% (wt/vol) N-lauroylsarcosine, giữ ở 55⁰C qua đêm. Hỗn dịch trên được rửa bằng dung dịch 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride và 10 mM Tris/ 1 mM EDTA (pH 8.0). Sau đó, hỗn dịch chứa DNA này được phân cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Xba*I qua đêm ở 37⁰C. Mẫu DNA sau khi phân cắt được điện di trên agarose 1% (Seakem Gold) bằng hệ thống CHEF-DR II (Bio-Rad, Hercules, Canada) với chương trình điện di là initial switch time trong 2,16 giây, final switch time trong 54,17 giây, thời gian điện di là 22 giờ ở hiệu điện thế 150 V. Gel sau điện di được nhuộm bằng ethidiumbromide, chụp ảnh và phân tích kết quả dựa trên tiêu chuẩn của Tenover và cs. (1995).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sự tương đồng genome của 18 chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập tại Nam Trung bộ - Tây Nguyên, 5 chủng phân lập một số tỉnh miền Bắc và 3 chủng phân lập tại miền Nam đã được xác định bằng phương pháp PFGE. Hai chủng vi khuẩn tham chiếu được sử dụng là M447 và 3081 do PSG.TS Nancy Cornick cung cấp. Genome của vi khuẩn *E. coli* được phân cắt bằng enzym *Xba*I và được điện di trên hệ thống điện di xung điện trường CHEF-DR II. Sự tương đồng về genome của các chủng vi khuẩn này được thể hiện ở hình 3.1a (chủng vi khuẩn mang kháng nguyên bám dính F4) và 3.1b (chủng vi khuẩn mang kháng nguyên bám dính F18).



Hình 3.1. Kết quả phân tích genome của vi khuẩn *E. coli* bằng phương pháp PFGE

(a) Chủng vi khuẩn mang kháng nguyên F4

(b) Chủng vi khuẩn mang kháng nguyên F18

(các số ghi trên hình chỉ mức độ tương đồng giữa các chủng vi khuẩn)

Theo Tenover và cs. (1995), mức độ tương đồng genome của các chủng vi khuẩn được chia thành các cấp độ khi phân tích bằng PFGE:

- *Không thể phân biệt được (không có sự khác biệt, Indistinguishable)*: thể hiện số vạch trên gel như nhau và kích thước các vạch tương tự nhau. Đây có thể là cùng 1 chủng gây bệnh và là chủng đại diện cho ổ dịch. Những chủng này cũng có thể không phân biệt được bằng các phương pháp khác.
- *Quan hệ rất gần (closely related)*: những chủng có sự khác biệt rất nhỏ chỉ với 1 yếu tố di truyền phân tử như 1 điểm đột biến, mất đi hoặc chèn thêm vào 1 đoạn DNA. Khi phân tích PFGE, các chủng này thể hiện sự sai khác ở 2-3 vạch. Những chủng này có thể là những chủng tham gia gây nên ổ dịch và có đặc điểm dịch tễ của bệnh tương đối giống nhau.
- *Có thể có quan hệ (possibly related)*: gồm những chủng có 2 điểm khác biệt về di truyền phân tử độc lập, thể hiện có trên gel là có 4-6 vạch khác nhau. Những chủng này có rất ít đặc điểm về dịch tễ với nhau như xa về vùng địa lý, đặc điểm khí hậu,...

- *Không có quan hệ*: có ít nhất 3 yếu tố di truyền phân tử độc lập khác nhau, thể hiện có ít nhất 7 band khác nhau. Các chủng này không có quan hệ với nhau về đặc điểm dịch tễ của bệnh cũng như khả năng gây bệnh.

Các chủng vi khuẩn được xếp vào các nhóm *không thể phân biệt, quan hệ rất gần* và *có thể có quan hệ* thường có mức độ tương đồng trên 85%.

Kết quả phân tích của chúng tôi cho thấy các chủng mang kháng nguyên F4 như BD173 và BD191, PT56 và TB10 là *không phân biệt*; các chủng có *quan hệ rất gần* là NT592 và NT580; BD191 và HY4; các chủng *có thể có quan hệ* là BD191 và BD197, BD197 và DL436, BD197 và KR. Như vậy có 8/15 chủng tương đồng ở mức trên 85%. Như vậy, sự sai khác về genome giữa các chủng mang kháng nguyên F4 gây bệnh tiêu chảy ở lợn con ở các khu vực của Việt Nam không có sự sai khác lớn. Việc lựa chọn chủng vi khuẩn *E. coli* mang kháng nguyên F4 để vacxin toàn khuẩn có thể đảm bảo được tính tương đồng kháng nguyên cao giữa chủng vi khuẩn có trong vacxin và chủng vi khuẩn gây bệnh thực địa.

Đối với các chủng vi khuẩn *E. coli* mang kháng nguyên F18, chỉ có 4/11 chủng có mức tương đồng trên 85% (*có thể có quan hệ*) là QN132 và HT, KT104 và BD347. Các chủng còn lại hầu như không có quan hệ với nhau (mức tương đồng dưới 85%). Điều này có nghĩa là tính kháng nguyên của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang kháng nguyên F18 gây bệnh ở các địa điểm khác nhau có thể khác nhau.

Năm 2000, Osek sử dụng phương pháp PFGE để phân tích 82 chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ lợn con tiêu chảy tại Ba Lan. Kết quả cho thấy các chủng vi khuẩn này chia thành 13 nhóm, các chủng vi khuẩn có cùng serotype huyết thanh thường có mức tương đồng cao. Khi phân tích tương đồng genome của 24 chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ lợn con tiêu chảy tại Cuba bằng phương pháp PFGE, Blanco và *cs.* (2006) cho biết mức độ tương đồng giữa các chủng vi khuẩn là rất thấp, có 18 nhóm / 24 chủng vi khuẩn được tạo ra với 1-4 chủng vi khuẩn/nhóm và mức độ tương đồng trong mỗi nhóm là 85%. Tương tự, Hung và *cs.* (2006) cho biết 46 chủng vi khuẩn khi phân tích bằng PFGE có thể được xếp thành 36 nhóm, trong đó có 9 nhóm (1-13 chủng vi khuẩn/nhóm) có quan hệ gần với nhau (mức độ tương đồng > 85%). Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của Lee và *cs.* (2009) cho thấy mức độ tương đồng của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ lợn con tại Hàn Quốc là rất thấp, chỉ có 4/74 chủng có mức tương đồng trên 80%.

Như vậy, mức độ tương đồng genome của các chủng vi khuẩn là không đồng nhất. Những chủng vi khuẩn gây bệnh tại các địa điểm khác nhau có thể mang một số yếu tố gây bệnh khác nhau hoặc có những biến đổi nhỏ trong genome. Điều này sẽ tạo nên tính đa dạng về kháng nguyên của chủng vi khuẩn gây bệnh. Vì vậy, trong chiến lược nghiên cứu, phát triển vacxin cần chú ý tìm được chủng vi khuẩn có tính tương đồng cao với các chủng gây bệnh trong cả nước nhằm đảm bảo khả năng bảo hộ của vacxin tại các khu vực chăn nuôi khác nhau. Có thể ứng dụng phương pháp điện di xung điện trường như là công cụ để phân tích đặc điểm dịch tễ ở mức độ phân tử các ca bệnh cũng như chọn lọc những chủng vi khuẩn điển hình dùng trong nghiên cứu, sản xuất vacxin phòng bệnh.

IV. KẾT LUẬN

Có 8/15 chủng vi khuẩn *E. coli* mang kháng nguyên F4 tương đồng ở mức trên 85%. Tuy nhiên, tỷ lệ tương đồng ở các chủng *E. coli* mang kháng nguyên F18 là thấp, chỉ có 4/11 chủng có mức tương đồng trên 85%. Các chủng vi khuẩn gây bệnh trên lợn tại các địa điểm khác nhau có thể có đặc tính kháng nguyên khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Thành Thìn, Đặng Văn Tuấn, Đặng Thanh Hiền, Lê Lập, Nguyễn Đức Tân, de Greve, H., B. Goddeeris, Nguyễn Việt Không, 2009. Phân tích một số yếu tố độc lực của vi khuẩn *E. coli* gây bệnh tiêu chảy ở lợn con ở một số tỉnh Nam trung bộ và Tây nguyên. *Tap chí NN và PTNT*, số 9, 52-57.
2. Blanco, M., Lazo, L., Blanco, J.E., Dahbi, G., Mora, A., López, C., 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.
3. Gyles, C.L., Fairbrother, J.M, 2010. *Escherichia coli*. In: Pathogenesis of bacterial infections in animal (4th edition). Editor: Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., and Thoen, C.O., *Blackwell publishing*, USA, 267-308.
4. Helgerson, A.F., Sharma, V., Dow, A.M., Schroeder, R., Post, K., Cornick, N.A., 2006. Edema disease caused by a clone of *Escherichia coli* O147. *J Clin Microbiol.*, 44(9), 3074-3077.
5. Hung, V.K., Holoda, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi, G., López, C., González, E.A., Blanco, J., 2006. Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *E. coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia. *BMC Vet Res.*, 20, 2-10.
6. Lee, S.I., Rayamahji, N., Lee, W.J., Cha, S.B., Shin, M.K., Roh, Y.M., Yoo, H.S., 2009. Genotypes, antibiogram, and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Escherichia coli* strains from piglets in Korea. *J Vet Diagn Invest.*, 21(4), 510-516.
7. Sambrook, J., and Russell, D.W. (editor). 2001. Chapter 5: Gel electrophoresis of DNA and Pulsed-field agarose gel electrophoresis. In: Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.*, 5.55-5.90.
8. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., and Swaminathan, B.. 1995. Intrepreting chromosomal DNA restriction paterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 2233-2239.