

XÁC ĐỊNH CÁC GEN ĐỘC TỐ VÀ KHẢ NĂNG GÂY BỆNH CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN *E. coli* O157:H7 PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ THỊT BÒ Ở KHU VỰC HÀ NỘI

Phạm Thị Tâm¹, Phạm Công Hoạt² và Tô Long Thành³

TÓM TẮT

4 chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 phân lập được từ thịt bò ở khu vực Hà Nội đều mang các gen mã hóa cho các độc tố *Stx* và *eae* được xác định bằng phương pháp PCR. Trong đó, 4/4 chủng đều mang gen mã hóa cho độc tố *Stx* 2, nhưng chỉ có 2/4 chủng mang gen mã hóa cho độc tố *Stx* 1. Thử nghiệm khả năng gây bệnh tích trên tế bào VERO đã chứng minh được rằng: Chỉ có 1 chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 M61 có khả năng sản sinh độc tố *Stx* gây bệnh tích trên tế bào VERO. Có thể kết luận rằng: 1 trong 4 chủng vi khuẩn phân lập được có khả năng gây ngộ độc thực phẩm.

Từ khoá: *E.coli* O157:H7, độc tố tế bào, gen mã hóa độc tố *Stx*, *eae* bệnh tích tế bào VERO

DETERMINATION OF GENES OF TOXINS AND PATHOGENESIS OF THE STRAINS *E. COLI* O157:H7 ISOLATED FROM BEEF SOLD IN HANOI

Phạm Thị Tâm, Phạm Công Hoạt, Tô Long Thành

SUMMARY

Using PCR method, it was demonstrated that 4 strains of *E.coli* O157:H7, isolated from beef sold in Hanoi, carried the genes encoding for the verotoxin *Stx* and *eae*. Concerning the *Stx*, all of these four strains carried the genes encoding for the verotoxin *Stx* 2, but for the *Stx* 1, the genes only appeared in two of four strains. From these four strains, the results obtained by Vero assay showed that only strain M61 of *E. coli* O157:H7 could produce toxin *Stx* causing CPE. It could be concluded that 1 of 4 isolated strains of *E. coli* can induce food toxication.

Keywords: *E.coli* O157:H7, cytotoxic, genes encoding the verotoxin *Stx* and *eae*, CPE on VERO cell.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 đã được xác định là có khả năng gây bệnh trên người từ năm 1982 ở Mỹ [1, 4, 6]. Kể từ đó đến nay, hàng loạt các vụ ngộ độc thực phẩm do vi khuẩn này đã được thông báo, ví dụ: năm 1996, tại Nhật Bản, có 9372 ca mắc bệnh do *E.coli* O157:H7, 12 người trong số đó đã tử vong. Vi khuẩn này có khả năng sản sinh một số độc tố, trong đó có *Stx* (độc tố ruột), *eae* (yếu tố bám dính); đây là các loại độc tố gây nên các biểu hiện bệnh trầm trọng như tiêu chảy ra máu, u rên huyết, viêm thận cấp, thậm chí gây tử vong [3, 5, 7, 8]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định sự có mặt của các gen mã hóa hai loại độc tố *Stx* và *eae* trong 4 chủng *E.coli* O157:H7 phân lập được từ thịt bò ở Hà Nội, đồng thời chứng minh khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn này.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu: Bốn chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7 sử dụng cho nghiên cứu này được phân lập từ 143 mẫu thịt bò thu thập tại Ba Vì, Đông Anh, Thanh Trì –Hà Nội từ tháng 6-9/2009 theo quy trình sau: Các mẫu thịt bò được bổ sung môi trường Brilliant Green Bile (BHI) có cefixime (50 mg/lit) theo tỷ lệ 1/10. Sau khi tăng sinh ở điều kiện 37°C/6 giờ, mẫu được cấy chuyển lên môi trường thạch MacConkey Sorbitol (SMAC). Trên môi trường này, khuẩn lạc của vi khuẩn

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Viện Đại học Mở Hà Nội;

² Bộ Khoa học và Công nghệ;

³ Cục Thú y

E.coli O157:H7 có màu vàng nâu nhạt do không lên men đường sorbitol. Nhặt các khuẩn lạc có màu sắc điển hình này cấy chuyển lên môi trường LB để thực hiện phản ứng ngưng kết trên hạt latex để phát hiện kháng nguyên O157 và H7 bằng KIT *E. coli* O157:H7 Latex Test Kit của hãng Remel. Các khuẩn lạc của vi khuẩn *E. coli* O157:H7 cho phản ứng dương tính với KIT này.

Các chủng vi khuẩn được xác định là *E. coli* O157:H7 bằng phản ứng miễn dịch học, được giải trình tự gen 16s rRNA để kết luận loài.

2.2 Phản ứng Multiplex PCR

ADN của vi khuẩn được tách bằng KIT tách chiết ADN của Hãng Gibco BRL Life Technology, USA.

Phản ứng PCR được thực hiện như sau:

- Thành phần phản ứng (50 μ l) gồm có: 200 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 50 mM Tris-HCl pH 9.0; 10 mM MgCl₂; 100pM mỗi *eae*, 75pM mỗi *Stx*1 và *Stx* 2 (trình tự các cặp mỗi được nêu trong bảng 1); 0.2 μ l Taq-DNA Polymerase; 4.8 μ l DNA mẫu; 25 μ l nước cất.

- Điều kiện phản ứng: Phản ứng được thực hiện với 1 tiền chu kỳ và 25 chu kỳ phản ứng ở các điều kiện như sau: 1) 94⁰C trong 5 phút; 2) biến tính ở 94⁰C trong 30 giây; 3) bắt cặp ở 60⁰C trong 60 giây; 4) đóng xoắn ở 72⁰C trong 90 giây.

Sản phẩm của phản ứng PCR được nhuộm bằng Ethidium Bromide và được phát hiện trên gel Agarose 1%. Các vạch ADN trên bản gel được phát hiện bằng cách quan sát và chụp ảnh dưới ánh sáng UV.

Bảng 1. Các cặp mồi trong phản ứng PCR phát hiện các gen độc tố của *E. coli* O157:H7 phân lập được và kích thước sản phẩm tạo thành

<i>Gen đích</i>	<i>Trật tự mồi</i>	<i>Sản phẩm</i>
<i>Stx</i> 1	F:5'- CGC TCT GCA ATA GGT ACT CC-3' R:5'-CGC TGT TGT ACC TGG AAA GG-3'	256 bp
<i>Stx</i> 2	F:5'-TCC ATG ACA ACG GAC AGC AG-3' R:5'- GC TTC TGC TGT GAC AGT GAC-3'	185 bp
<i>eaeA</i>	3'-CCGGAATTCTGGGATCGATTACCGTCAT 5'; 5'-CCAAGCTTTTATTTATCAGCCTTAATCTC-3'	618 bp

2.3. Phương pháp tách độc tố của vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7 được nuôi lắc ở 37⁰C/18 giờ trong môi trường CAYE có thành phần như sau: 2% casamino acid; 0,6% yeast extract; 0,25% NaCl; 0,87% K₂HPO₄; 0,0005% MgSO₄; 0,0005% FeCl₃. Ly tâm canh khuẩn, thu dịch nổi, lọc qua lưới lọc có kích thước 0,22 μ m rồi thu phần dịch phía dưới. Xác định thành phần độc tố bằng phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE.

2.4 Phương pháp gây nhiễm độc tố trên tế bào VERO

Tế bào thận khỉ xanh Châu Phi (VERO) được nuôi trong tủ ẩm 37⁰C, có 5% CO₂, trong môi trường dinh dưỡng gồm có MEM 199 và 5% huyết thanh thai bê (Gibco BRL Life Technology, Mỹ) để đạt mật độ là 2x10⁵ tế bào/ml. Phương pháp gây nhiễm độc tố trên tế bào VERO để xác định khả năng gây bệnh tích tế bào được thực hiện trên đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng (Corning, Mỹ), mỗi giếng chứa 100 μ l huyền dịch tế bào có mật độ tế bào như trên.

Độc tố pha loãng với các tỷ lệ từ 10⁻¹ -10⁻¹⁰ rồi bổ sung vào mỗi giếng nuôi tế bào 50 μ l.

Tiếp tục ủ các đĩa tế bào nuôi trong tủ ẩm 5% CO₂. Kiểm tra bệnh tích tế bào tại các thời điểm cứ sau 6 giờ một lần.

2.5 Phương pháp điện di trên gel Agarose 0,8%

Mẫu ADN có bổ sung màu Bromophenol Blue với tỉ lệ 1:5 được tra vào các giếng trong bản gel. ADN di chuyển từ điện cực âm sang điện cực dương. Quá trình điện di xảy ra ở 120 V trong 25-30 phút. Sau khi điện di, bản gel được lấy nhẹ nhàng ra khỏi khuôn và ngâm vào dung dịch Ethidium Bromide với nồng độ 2µg/ml trong khoảng thời gian 5 phút, lắc nhẹ. Bản gel sau đó được tráng qua nước cất và được quan sát dưới ánh sáng tia tử ngoại của máy soi chụp gel.

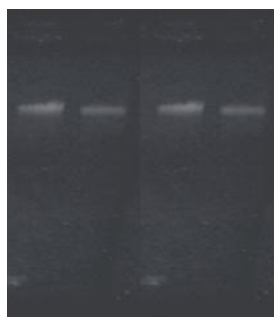
2.6 Phương pháp điện di trên gel SDS-PAGE

Độc tố có bản chất là protein sẽ di chuyển từ điện cực âm sang điện cực dương trên gel polyacrylamide bán liên tục có chứa SDS 12% acrylamide. Quá trình điện di yêu cầu hiệu điện thế luôn giữ ổn định ở 120V trong khoảng thời gian 25-30 phút. Lượng protein đưa vào mỗi giếng là 17 µg.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả xác định gen mã hóa độc tố của các chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7 phân lập được

Bốn chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7 phân lập được từ 143 mẫu thịt bò bán ở khu vực Hà Nội được nuôi tăng sinh trong môi trường LB và được tách ADN tổng số bằng KIT tách chiết ADN của hãng GIBCO, Mỹ. Kết quả tách chiết ADN được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% (Hình 1). Kết quả trên hình này cho thấy các mẫu được tách chiết sau khi



Hình 1. Kết quả tách chiết ADN tổng số của 4 chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7

điện di đều xuất hiện 1 băng sáng, không bị đứt gãy. Điều đó chứng tỏ ADN tổng số đã được tách chiết từ tế bào vi khuẩn với độ nguyên vẹn và tinh sạch tương đối cao. Kết quả thu được cho phép sử dụng ADN tổng số để thực hiện phản ứng Multiplex PCR với mục đích phát hiện các gen mã hóa độc tố.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định 3 gen mã hoá cho các độc tố *Stx1*, *Stx2* và *eae* của 4 chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7. Sở dĩ chúng tôi lựa chọn phát hiện các gen này vì theo báo cáo của James và cộng sự (1998) [2], đây là các loại độc tố có liên quan mật thiết đến khả năng gây bệnh của vi khuẩn *E.coli* O157:H7, trong đó gen *Stx* mã hóa nên độc tố ruột, là nguyên nhân gây hội chứng ure huyết trên bệnh nhân, còn gen

eae mã hoá nên yếu tố bám dính OPM intimin, đây là yếu tố then chốt giúp cho vi khuẩn tấn công qua niêm mạc của đường tiêu hóa.

Với 3 cặp mồi đặc hiệu cho các gen *eae*, *Stx1*, *Stx2*, chúng tôi thu được kết quả của phản ứng PCR như được nêu trong Bảng 2 và trên Hình 2.

Bảng 2. Kết quả xác định các gen độc tố của 4 chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7

STT	Ký hiệu chủng vi khuẩn	Nguồn gốc	Gen độc tố		
			<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>eae</i>
1	M8	Ba Vì	-	+	+
2	M9	Ba Vì	-	+	+
3	M61	Đông Anh	+	+	+
4	M128	Hà Nội	+	+	+

Như vậy, có thể thấy rằng cả 4 chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7 mà chúng tôi phân lập được trên thịt bò bán tại khu vực Hà Nội đều mang gen mã hóa độc tố *Stx2* và *eae*, trong khi đó,



Hình 2. Kết quả xác định các gen độc tố của 4 chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7 (cột 1: thang DNA chuẩn, cột 2: M61, cột 3: M128, cột 4: M8, cột 5: M9)

chỉ có 2 chủng mang gen mã hóa độc tố *Stx1*. Kết quả này là ngược lại với nghiên cứu của Nazmul và cộng sự (2008) [4] ở Malaysia, là một đất nước có điều kiện khí hậu tương tự với Việt Nam. Kết quả của các tác giả này cho thấy 10/30 chủng vi khuẩn *E.coli* O157: H7 gây bệnh cho trẻ em ở nước này mang gen mã hóa độc tố *Stx1*, trong khi đó gen mã hóa *Stx2* không có mặt ở cả 30 chủng được nghiên cứu. Theo báo cáo của Nataro và cộng sự (1998) [2] cho biết, các chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7 mang độc tố *Stx2* có khả năng gây hội chứng ure huyết gặp phổ biến hơn và triệu chứng bệnh trầm trọng hơn so với các chủng chỉ mang độc tố *Stx1* hoặc mang cả hai loại độc tố này. Bên cạnh đó, các tác giả này cũng khẳng định *eae* là gen quyết định mã hóa nên phân tử protein intimin có kích thước 94-97 Kda, đây là thành phần protein tạo nên khả năng bám dính của vi khuẩn vào tế bào niêm mạc

ruột, mở đường cho sự tấn công của vi khuẩn vào vật chủ. Từ kết quả thu được, có thể nhận thấy: mặc dù tỷ lệ phát hiện vi khuẩn *E.coli* O157:H7 trong thịt bò không cao (2,8%), nhưng tất cả các chủng này đều mang 2-3 gen độc tố. Cũng ở khu vực ngoại thành Hà Nội, theo báo cáo điều tra của Noboru Nakasone và cộng sự năm 2008 [5], 2% mẫu phân bò nuôi ở khu vực này có mang các gen độc tố của vi khuẩn *E.coli* O157:H7. Như vậy số liệu mà chúng tôi thu được trong thịt bò cao hơn khoảng 0,8%. Tuy nhiên, với điều kiện vệ sinh chăn nuôi và vệ sinh giết mổ như hiện nay, khả năng nhiễm chéo vi khuẩn từ phân vào thịt bò, vào nước sinh hoạt và thực phẩm là điều rất dễ dàng xảy ra.

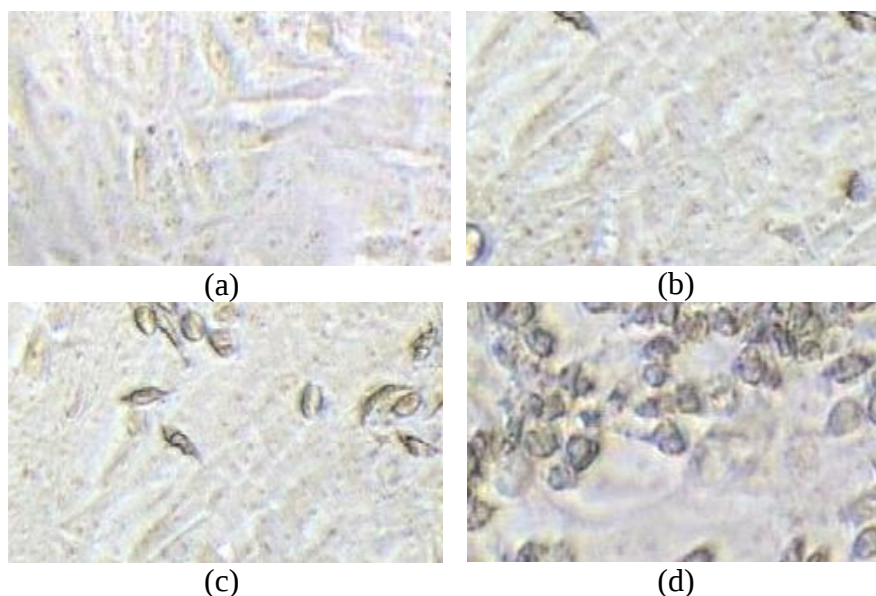
3.2 Kết quả xác định khả năng sinh độc tố tế bào và gây bệnh tích trên tế bào VERO

Vi khuẩn *E.coli* O157:H7 đã được xác định là một trong những loài vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm. Tuy nhiên, một chủng vi khuẩn nào đó có khả năng gây ngộ độc thực phẩm thực phẩm hay không, cần phải chứng minh được khả năng gây bệnh của nó. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng tế bào VERO để xác định khả năng gây bệnh tích của độc tố cytotoxin của các chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7 phân lập được trong thịt bò.

Tế bào VERO được nuôi cấy trong đĩa 96 giếng rồi bổ sung 50μl dịch chiết có chứa độc tố của 4 chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7 với độ pha loãng từ 10^{-1} đến 10^{-10} . Tiếp tục nuôi tế bào ở nhiệt độ 37°C trong tủ ẩm có CO₂ và theo dõi khả năng gây bệnh tích tế bào sau các khoảng thời gian 6 tiếng kể từ sau khi gây nhiễm.

Kết quả theo dõi bệnh tích tế bào đã chứng tỏ rằng, chỉ có chủng *E.coli* O157:H7 M61 có khả năng sản sinh độc tố gây độc tế bào. Ở các giếng bổ sung độc tố của vi khuẩn này ở độ pha loãng từ 10^{-1} - 10^{-5} , bắt đầu từ 18 giờ sau khi gây nhiễm trở đi, tế bào có các biểu hiện biến dạng, biểu hiện co nguyên sinh chất và nhăn, đến 24 giờ sau khi gây nhiễm bắt đầu xuất hiện các đám tế bào chết, bong ra khỏi bề mặt nuôi cấy. Hiện tượng tế bào chết do tác động của độc tố mạnh mẽ nhất ở giai đoạn 48 giờ sau khi gây nhiễm, ở giai đoạn này, thậm chí tế bào rách hàng loạt, tỷ lệ tế bào chết bong ra khỏi bề mặt nuôi cấy lên đến trên 90% (hình 3a, b, c, d). Trong khi đó, tế bào

VERO được bổ sung dịch chiết của 3 chủng *E.coli* O157:H7 M8, M9 và M128 không có biểu hiện bệnh tích cho đến ngày theo dõi thứ 5.



Hình 3. Biểu hiện bệnh tích trên tế bào VERO được gây nhiễm bằng độc tố Stx tách từ chủng *E.coli* O157:H7 M61 (độ pha loãng 10^{-2}). (a): tế bào trước khi gây nhiễm; (b): tế bào sau khi gây nhiễm 18 giờ; (c): tế bào sau khi gây nhiễm 24 giờ; (d): tế bào sau khi gây nhiễm 48 giờ.

Như vậy, có thể thấy rằng: mặc dù cả 4 chủng *E.coli* O157:H7 phân lập được từ thịt bò đều mang gen mã hóa các độc tố Stx và eae nhưng thử nghiệm khả năng gây bệnh tích trên tế bào VERO đã chứng minh được duy nhất 1 chủng *E.coli* O157:H7 ký hiệu M61 là có khả năng sinh độc tố và độc tố này có khả năng gây bệnh tích trên tế bào VERO. Theo báo cáo của Nataro và cộng sự (1998) [2], độc tố gây bệnh tích tế bào của vi khuẩn *E.coli* O157:H7 là Stx, điều này chứng tỏ chủng vi khuẩn ký hiệu M61 có khả năng sản sinh độc tố này. Bên cạnh đó, mặc dù cả 3 chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7 còn lại mà chúng tôi phân lập được đều mang gen mã hóa 1 hoặc 2 loại độc tố Stx nhưng có thể các gen này không biểu hiện vì vậy không tạo ra độc tố tế bào.

Tuy nhiên, ở nghiên cứu này, chúng tôi mới chỉ xác định được khả năng gây bệnh tích tế bào, đối với vi khuẩn *E.coli* O157:H7, vai trò của độc tố eae với khả năng gây bệnh đã được báo cáo bởi Paton và cộng sự (1998) [3], vì vậy cần phải có các nghiên cứu tiếp theo để đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7 phân lập và vai trò của các loại độc tố mà chúng sản sinh ra.

Tóm lại, cả bốn chủng vi khuẩn *E.coli* O157:H7 mà chúng tôi phân lập được từ thịt bò ở khu vực Hà Nội đều mang gen mã hóa các loại độc tố điển hình của vi khuẩn EHEC như Stx, eae. Tuy vậy, thử nghiệm trên tế bào VERO cho thấy: chỉ 1 chủng trong số đó sản sinh độc tố tế bào. Chính vì thế, cần thiết phải có các nghiên cứu trên các đối tượng khác để chứng minh khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chang-Kyu Sohn, Wan Huh, Byung-Chun Kim, and Wan Park. (2000). *Producing Verotoxin 2 Isolated from a Patient in Korea*. The Journal of Microbiology, p.93-98 Vol. 38, No. 2.
2. Nataro, J and James B. Kaper. (1998). *Clinical Microbiology Reviews*. p. 142–201 Vol. 11, No. 1.
3. Paton, J.C. and Adrienne W.Paton (1998). *Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections*. Clinical Microbiology Reviews, p. 450–479 Vol. 11, No. 3
4. Nazmul MHM, Salmah I, Jamal H, Ansary A. *Detection and molecular characterization of verotoxin gene in non-O157 diarrheagenic Escherichia coli isolated from Miri hospital, Sarawak, Malaysia*. Biomedical Research 2007; 18: 39-43.
5. Nester Dickie, Joan I. Speirs, Mumtaz Akhtar, Wendy M. Johnson and Richard A. Szabo.(1989). *Purification of an Escherichia coli serogroup O157:H7 verotoxin and its detection in North American hemorrhagic colitis isolates*. Journal of Clinical Microbiology, Sept. 1989, p. 1973-1978 Vol. 27. No. 9.
6. Noboru Nakasone, Hoang Huy Tran, Minh Binh Nguyen, Naom Higa, Claudia Toma Tianyan Song, Yochio Ichinose. (2005). *Shorth report: Isolation of E.coli O157:H7 from fecal samples of cows in Vietnam*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 73(3), 2005, pp. 586–587.
7. Perera, L. P., L. R. M. Marqués, and A. D. O'Brien. (1988). *Isolation and characterization of monoclonal antibodies to Shiga-like toxin II enterohemorrhagic E. coli and use of the monoclonal antibodies in a colony enzyme-linked immunosorbent assay*. J. Clin. Microbiol. 26:2127-2131
8. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, et al. (1983). *Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype*. N Engl J Med 308:681-685.