

PHÂN LẬP MỘT SỐ THỰC KHUẨN THỂ (BACTERIOPHAGES) CÓ KHẢ NĂNG LOẠI TRỪ VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* GÂY BỆNH ĐƯỜNG HÔ HẤP TRÊN GÀ

Daosavanh Keomany¹, Luru Huỳnh Anh², Huỳnh Tấn Lộc¹, Nguyễn Trọng Ngự¹

TÓM TẮT

Thí nghiệm được tiến hành nhằm phân lập và đánh giá khả năng phân giải vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) gây bệnh đường hô hấp trên gà của thực khuẩn thể (bacteriophages) tại các trại gà nòi ở tỉnh An Giang và thành phố Cần Thơ. Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các mẫu dịch đường hô hấp gà và mẫu đất đều có sự hiện diện của vi khuẩn *E. coli*, chiếm tỷ lệ 100%. Đã phân lập được 18/72 mẫu chứa thực khuẩn thể có khả năng phân giải vi khuẩn *E. coli* (chiếm tỷ lệ 25,0%). Bằng kỹ thuật PCR, đã xác định được sự hiện diện của 3 gen độc lực, đó là *papC*, *iss* và *tsh* trên vi khuẩn *E. coli* với tỷ lệ lần lượt là 30,6%, 31,9% và 31,9%. Kết quả đánh giá khả năng phân giải chủng vi khuẩn *E. coli* E.Đ.BĐ1 ở tỉnh An Giang và chủng vi khuẩn *E. coli* E.Đ.CĐ6 ở thành phố Cần Thơ qua 3 thời điểm 24, 48 và 72 giờ cho thấy, thực khuẩn thể P.DH.MHH6 và P.Đ.CĐ3 có khả năng phân giải cao hơn các thực khuẩn thể còn lại. Dựa vào nghiên cứu này có thể sử dụng thực khuẩn thể P.DH.MHH6 và P.Đ.CĐ3 thử nghiệm trên gà để đánh giá hiệu quả phòng và trị bệnh do vi khuẩn *E. coli* gây ra.

Từ khóa: thực khuẩn thể, *E. coli*, gen *papC*, *iss*, *tsh*.

Study on capability of bacteriophages in dissolving pathogenic *Escherichia coli* caused respiratory disease in chickens

Daosavanh Keomany, Luu Huỳnh Anh, Huỳnh Tấn Lộc, Nguyễn Trọng Ngự

SUMMARY

The study was conducted to isolate and evaluate the bacteriophages having capability to dissolve pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*) that caused respiratory disease in the Noi chickens raising in An Giang province and Can Tho city. The studied result showed that *E. coli* presented in all samples (100%) and a total of 18 bacteriophages (25%) were isolated. By PCR technique, three virulent genes, such as: *papC*, *iss* and *tsh* were identified in *E. coli* with the rate of 30.6%, 31.9%, and 31.9%, respectively. The results of evaluating capability of bacteriophages in dissolving the pathogenic *E. coli* E.D.BD1 strain in An Giang province and *E. coli* E.D.CD6 strain in Can Tho city at 24, 48, and 72 hours showed that P.DH.MHH6 and P.D.CD3 bacteriophages presented higher capability in dissolving *E. coli* than others. P.DH.MHH6 and P.D.CD3 are therefore potential bacteriophages for testing the effective prevention and treatment for the respiratory diseases in chickens caused by *E. coli*.

Keywords: Bacteriophages, *E. coli*, gene *papC*, *iss*, *tsh*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) có thể là tác nhân gây ra các bệnh liên quan đến đường hô hấp ở gà như nhiễm trùng đường hô hấp và túi khí (Nguyễn Bá Hiên và *ctv.*, 2012). Bên

cạnh đó, theo Nguyễn Đức Hiên (2017), bệnh do vi khuẩn *E. coli* gây ra là một trong những nguyên nhân gây ra tổn thất kinh tế đáng kể trong chăn nuôi gia cầm, đặc biệt gà nhiễm khuẩn huyết (colisepticemia) có thể làm giảm

¹ Bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

² Bộ môn Chăn nuôi, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

43% chất lượng thân thịt. Nhằm góp phần hạn chế các rủi ro do vi khuẩn gây ra, các cơ sở chăn nuôi đã sử dụng kháng sinh một cách liên tục trên cả gà khỏe, gà chưa có biểu hiện bệnh, dẫn đến hiện tượng kháng thuốc của vi khuẩn, làm giảm hiệu quả điều trị bệnh (Van den Bogaard *et al.*, 2000). Vì vậy, hiện nay các nhà nghiên cứu đang tìm kiếm các chế phẩm sinh học thay thế kháng sinh trong điều trị bệnh nhằm ngăn chặn tình trạng kháng thuốc của vi khuẩn. Theo Pirisi (2000), thực khuẩn thể (TKT) là hiện tượng virus có thể nhân lên trong tế bào vi khuẩn và phá vỡ tế bào vi khuẩn trong thời gian ngắn. Theo Balogh (2002), từ những năm 1990, TKT được chứng minh là có hiệu quả kiểm soát một số vi khuẩn gây bệnh bao gồm *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus*, *Salmonella* spp., *Shigella* và *Vibrio cholerae*. Thêm vào đó, Huff *et al.* (2002) cũng đã thành công trong việc sử dụng TKT điều trị viêm đường hô hấp do *E. coli* gây ra trên gà thịt tại Mỹ. Ở Việt Nam, TKT cũng đã được sử dụng trong phòng trừ vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh trên hoa cúc (Huỳnh Ngọc Tâm và ctv., 2017) và vi khuẩn *E. coli* gây bệnh đường ruột trên gà (Mai Huỳnh Dur An và ctv., 2016). Tuy nhiên, các nghiên cứu sử dụng TKT trong việc kiểm soát vi khuẩn *E. coli* gây bệnh đường hô hấp trên gà ở Việt Nam chưa được thực hiện, vì vậy nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu phân lập và xác định khả năng phân giải của TKT đối với vi khuẩn *E. coli* gây bệnh đường hô hấp trên gà trong điều kiện phòng thí nghiệm, từ đó tìm ra TKT có hoạt lực cao nhằm làm nền tảng cho các nghiên cứu ứng dụng TKT sau này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Tổng cộng có 36 mẫu đất và 36 mẫu dịch đường hô hấp thu được từ 6 trại gà nòi trên địa bàn tỉnh An Giang, gồm phường Bình Đức (12 mẫu), phường Mỹ Hoà (12 mẫu), xã Mỹ Hoà Hưng (12 mẫu) và Thành phố Cần Thơ gồm các huyện Cái Răng (12 mẫu), huyện Phong Điền

(12 mẫu) và huyện Cờ Đỏ (12 mẫu).

Các hóa chất, môi trường sử dụng cho phản ứng PCR: Electrophoresis buffer TAE 1X, Agarose 1,5%, dung dịch Ethidium Bromide (10 mg/ml), Master mix 2X, các primer được thiết kế để xác định gen gây bệnh của vi khuẩn *E. coli* (Cty PHUSA Biochem).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp lấy mẫu

Mẫu đất: thu tại 5 vị trí khác nhau theo quy tắc đường chéo, mỗi vị trí lấy 10 g và được trộn đều thành 1 mẫu (Sava, 1994).

Mẫu đường hô hấp: dùng tăm bông vô trùng cho nhẹ nhàng vào cổ họng gà, sau đó cho vào ống falcon có chứa 10 ml nước cất và đậy kín nắp (TCVN 7924-1: 2008).

Tất cả các mẫu được ghi ký hiệu và cho vào thùng đá trữ lạnh, sau đó mang về phòng thí nghiệm giữ ở 4°C và tiến hành phân lập trong 24 giờ.

2.2.2. Nuôi cấy và phân lập các chủng vi khuẩn *Escherichia coli*

Hút 20µl dung dịch mẫu, cấy lên đĩa petri chứa môi trường Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) chuyên biệt dành cho *E. coli* (Gross *et al.*, 1985), ủ ở 37°C trong 24 giờ. Tiếp theo, chọn những khuẩn lạc *E. coli* riêng rẽ (màu xanh dương) trên môi trường TBX cấy sang đĩa chứa môi trường TSA, ủ ấm ở 37°C trong 24 giờ để tăng sinh vi khuẩn, sau đó tiến hành thu hoạch và giữ giống (Nguyễn Tiến Dũng, 2009).

2.2.3. Khảo sát sự biểu hiện của các gen độc lực trên các chủng *Escherichia coli*

Trình tự các cặp môi được sử dụng để xác định gen độc lực và chu trình nhiệt cho phản ứng PCR được dựa theo Ana *et al.* (2008): (i) gen *papC* (pielonefritis associated to pili), môi xuôi: 5'- GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G-3' và môi ngược 5'- ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A-3'; Ta = 52°C, sản phẩm khuếch đại 328 bp; (ii) gen *tsh* (temperature sensitive haemagglutinin), môi

xuôi: 5'- GGT GGT GCA CTG GAG TGG-3' và môi ngược 5'- AGT CCA GCG TGA TAG TGG-3'; Ta = 62°C, sản phẩm khuếch đại 620 bp và (iii) gen *iss* (increased serum survival), môi xuôi: 5'- GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC-3' và môi ngược 5'- CGC CTC GGG GTG GAT AA-3'; Ta = 66°C, sản phẩm khuếch đại 760 bp.

2.2.4. Phân lập các thực khuẩn thể phân giải vi khuẩn *Escherichia coli*

Thực hiện phương pháp pha loãng và đo độ đục bằng máy OD quang phổ ở bước sóng 600 nm để thu huyền phù của từng dòng *E. coli* với OD = 0,3-0,5, tương đương mật độ 10^8 cfu/ml (Huff *et al.*, 2002). Hút 2 ml hỗn hợp (sau tăng sinh) ly tâm với vận tốc 6.000 vòng/phút trong 15 phút, thu phần dịch trong cho vào ống eppendorf chứa lượng tương đương chloroform để tiêu diệt tế bào vi khuẩn, ủ 1 giờ. Sau đó, ly tâm hỗn hợp với tốc độ 6.000 vòng/phút trong 15 phút và thu lấy dung dịch TKT thô, bảo quản trong tối ở 4°C (Kropinski *et al.*, 2009).

2.2.5. Đánh giá phổ ký chủ của các thực khuẩn thể phân lập

Sử dụng phương pháp khảo sát vết tan bằng agar hai lớp với bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại. Chuẩn bị đĩa môi trường TSB (1,7% agar) đã được kê ô, sau đó cho hỗn hợp gồm 10 ml môi trường TSB (0,6% agar) và 0,1 ml huyền phù *E. coli* (10^8 cfu/ml) vào đĩa. Sau đó, nhỏ 3 μ L từng TKT vào ô kê tương ứng và ủ ở 37°C trong 24 giờ và quan sát vết tan (Kropinski *et al.*, 2009).

2.2.6. Đánh giá khả năng phân giải vi khuẩn *Escherichia coli* của thực khuẩn thể

Đồng nhất hỗn hợp gồm 0,1 ml dung dịch từng TKT và 0,9 ml nước cất, cho vào ống eppendorf, sau đó pha loãng về các nồng độ từ 10^{-1} - 10^{-9} . Hút 0,05 ml huyền phù của từng TKT

ở từng nồng độ pha loãng khác nhau cho vào đĩa petri vô trùng, sau đó bổ sung 0,1 ml huyền phù vi khuẩn *E. coli* ký chủ (10^8 cfu/ml) được chọn và 10 ml môi trường TSB (0,6% agar) vào đĩa petri, lắc nhẹ đĩa cho đồng nhất hỗn hợp, ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó tiến hành chọn một đĩa petri có mật độ khoảng 10^{-3} cfu/ml để tiến hành so sánh và ghi nhận đường kính các vòng vô khuẩn (plaques) của các thực khuẩn thể tạo ra trên bề mặt đĩa petri vào các thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ sau khi nuôi cấy, bằng cách dùng thước đo đường kính 3 vòng vô khuẩn ngẫu nhiên trên mỗi đĩa petri (Wang *et al.*, 2006).

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2013 và được phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab 17.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập *E. coli* và thực khuẩn thể

Kết quả phân lập vi khuẩn *E. coli* cho thấy, các chủng vi khuẩn này hiện diện trong các mẫu đất và mẫu dịch hô hấp trên gà với tỷ lệ khá cao (100%, 72/72 mẫu). Kết quả ở bảng 1 cho thấy, tổng cộng 18 TKT được phân lập, chiếm tỷ lệ 25,0%, trong đó, tinh An Giang phân lập được 10 thực khuẩn thể (chiếm tỷ lệ 27,8%) và thành phố Cần Thơ phân lập được 8 thực khuẩn thể (chiếm tỷ lệ 22,2%) có khả năng ký sinh phân giải vi khuẩn *E. coli* tương ứng từng ký chủ. Khi phân lập TKT ký sinh, vi khuẩn *E. coli* từ phân và đất tại các trại nuôi gia súc ở Tokyo - Nhật Bản, Tanji *et al.* (2004) cũng cho thấy có sự hiện diện của các TKT trong 211 mẫu phân và đất với tỷ lệ 12,3%.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, TKT tồn tại trong các mẫu phân lập khá cao (25,0%) và cao hơn so với nghiên cứu của Tanji *et al.* (2004).

Bảng 1. Tỷ lệ hiện diện của thực khuẩn thể ký sinh trên *E. coli* ở tỉnh An Giang và thành phố Cần Thơ

Địa điểm	Mẫu đất			Mẫu dịch hô hấp			Tổng cộng		
	Số chủng <i>E. coli</i>	Số TKT	Tỷ lệ (%)	Số chủng <i>E. coli</i>	Số TKT	Tỷ lệ (%)	Số chủng <i>E. coli</i>	Số TKT	Tỷ lệ (%)
An Giang	18	4	22,2	18	6	33,3	36	10	27,8
Cần Thơ	18	6	33,3	18	2	11,1	36	8	22,2
Tổng	36	10	27,8	36	8	22,2	72	18	25,0

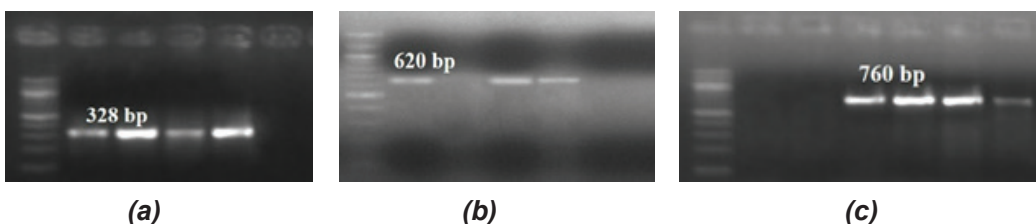
TKT: Thực khuẩn thể

3.2. Sự biểu hiện của các gen độc lực trên các chủng vi khuẩn *Escherichia coli*

Tiến hành khảo sát sự biểu hiện của 3 gen độc lực *papC*, *tsh* và *iss* bằng phương pháp PCR.

Bảng 2. Kết quả phân lập và số lượng *E. coli* mang gen độc lực

STT	Gen gây bệnh	Số lượng chủng mang gen/72 chủng kiểm tra	Tỷ lệ (%)
1	<i>iss</i>	23	31,94
2	<i>papC</i>	22	30,56
3	<i>tsh</i>	23	31,94



Hình 1. Sản phẩm PCR của các gen độc lực *papC* (a), *tsh* (b) và *iss* (c) sau quá trình điện di

Kết quả trình bày ở bảng 2 cho thấy, sự hiện diện của 3 gen độc lực *papC*, *tsh* và *iss* trên các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập với tỷ lệ khá cao, trong đó tìm thấy 23 chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen *tsh* và *iss*, chiếm tỷ lệ 31,94%, cao hơn so với chủng *E. coli* mang gen *papC* (chiếm tỷ lệ 30,56%). Kết quả nghiên cứu hiện tại thể hiện thấp hơn so với nghiên cứu của Sonal *et al.* (2017), nhóm tác giả cho thấy, tỷ lệ hiện diện của các gen *papC*, *tsh* và *iss* trên các chủng *E. coli* phân lập từ phế quản các loài chim mắc bệnh đường hô hấp khá cao, cụ thể gen *papC* chiếm tỷ lệ 33,3%, gen *tsh* (50%), gen

iss (90%). Bên cạnh đó, sự hiện diện của gen độc lực *papC* cũng đã được Ana *et al.* (2009) tìm thấy trên các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ đường hô hấp của gia cầm với tỷ lệ mang gen là 24,3%, thấp hơn so với kết quả nghiên cứu hiện tại (30,56%).

Kết quả trình bày ở bảng 3 cho thấy, các chủng *E. coli* chứa ít nhất từ 2 đến 3 gen ghép ở mỗi chủng, trong đó có 19 chủng có sự hiện diện của 2 gen gây bệnh với 3 kiểu ghép khác nhau, 1 chủng có sự hiện diện của 3 gen gây bệnh với 1 kiểu ghép. Kết quả ở bảng 3 cũng cho thấy, trong 4 loại kiểu ghép của gen gây

Bảng 3. Tỷ lệ các kiểu ghép của gen gây bệnh ở các chủng *E. coli*

Số gen ghép	Kiểu gen	Số kiểu gen ghép	Chủng (%)
3	<i>papC + tsh + iss</i>	1	1 (1,39)
2	<i>papC + tsh</i>	3	3 (4,17)
	<i>papC + iss</i>		6 (8,33)
	<i>tsh + iss</i>		10 (13,89)

bệnh, kiểu ghép chiếm tỷ lệ cao nhất với sự có mặt của 2 gen là *tsh* và *iss* (13,89%) hiện diện trên 10 chủng *E. coli* phân lập được. Tiếp theo là kiểu ghép giữa hai gen *papC* và *iss* (8,33%), *papC* và *tsh* (4,17%) và thấp nhất là kiểu ghép với sự hiện diện của cả 3 gen *papC*, *tsh* và *iss* (1,39%). Điều này cho thấy các gen đều có mối liên hệ trực tiếp với nhau đảm bảo cho quá trình xâm nhập và gây bệnh của vi khuẩn *E. coli*, sự thiếu vắng của một trong các gen gây bệnh của các chủng *E. coli* đã tạo nên đặc trưng gây bệnh của từng serotype.

3.3. Kết quả đánh giá phổ ký chủ của các thực khuẩn thể trên vi khuẩn *Escherichia coli*

Kết quả kiểm tra phổ ký chủ của 10 TKT đối với 36 chủng vi khuẩn *E. coli* tại tỉnh An Giang cho thấy, 4 thực khuẩn thể P.DH.MHH6, P.DH.MH1, P.Đ.MHH3 và P.Đ.MHH4 có phổ ký chủ rộng, với số lượng chủng *E. coli* bị ký sinh lần lượt là 23, 21, 21 và 12 chủng trong tổng số 36 chủng *E. coli* được phân lập, chiếm tỷ lệ lần lượt là 63,8%, 58,3%, 58,3 % và 33,3%. Đối với thành phố Cần Thơ, trong tổng số 36 chủng *E. coli* và 8 TKT phân lập được, kết quả tìm thấy thực khuẩn thể P.Đ.CĐ3, P.Đ.CĐ6, P.Đ.CĐ4 và P.Đ.CR1 có phổ ký chủ rộng, với số lượng chủng *E. coli* bị ký sinh lần lượt là 26, 25, 16 và 18, chiếm tỷ lệ lần lượt là 72,2%, 69,4%, 44,4% và 50,0% (bảng 4).

Bảng 4. Kết quả đánh giá phổ ký chủ của các thực khuẩn thể trên vi khuẩn *E. coli*

Địa điểm	Thực khuẩn thể	Số lượng chủng <i>E. coli</i> bị phân giải	Tỷ lệ (%)
An Giang	P.Đ.MH5	4	11,1
	P.DH.MH1	21	58,3
	P.Đ.BĐ5	6	16,7
	P.DH.BĐ3	10	27,8
	P.DH.BĐ5	8	22,2
	P.DH.BĐ6	6	16,7
	P.Đ.MHH2	7	19,4
	P.Đ.MHH4	12	33,3
	P.DH.MHH3	21	58,3
	P.DH.MHH6	23	63,8
	P.Đ.CĐ3	26	72,2
	P.Đ.CĐ6	25	69,4
	P.Đ.CĐ4	16	44,4
Cần Thơ	P.Đ.CR1	18	50,0
	P.Đ.CR3	8	22,2
	P.DH.PĐ4	10	27,8
	P.DH.CĐ3	13	26,1
	P.DH.PĐ1	11	30,6

Nghiên cứu của Huỳnh Chí Nghĩa (2016) cũng đã phân lập được các thực khuẩn thể PD6, PN10, PD11, PD14 và PN15 với phổ ký chủ lần lượt là 6, 8, 7, 5 và 6 chủng trong tổng số 32 chủng vi khuẩn *E. coli* được phân lập, chiếm tỷ lệ lần lượt là 18,8%, 25%, 21,9%, 15,6 % và 18,8%, thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Kết quả trên cho thấy, các TKT phân lập được có phổ ký chủ rộng (có khả năng

ký sinh trên nhiều chủng *E. coli* khác nhau), vì vậy có thể tuyển chọn các TKT này trong việc nghiên cứu khả năng phòng và trị bệnh do vi khuẩn *E. coli* gây ra.

3.4. Kết quả đánh giá khả năng phân giải chủng vi khuẩn *Escherichia coli* E.DH.BĐ1 và E.Đ.CĐ6 của các thực khuẩn thể phân lập từ tỉnh An Giang và thành phố Cần Thơ

Bảng 5. Đường kính phân giải của thực khuẩn thể với vi khuẩn *E. coli* trong điều kiện phòng thí nghiệm

Địa điểm	Thực khuẩn thể	Đường kính phân giải (mm)		
		24 giờ	48 giờ	72 giờ
An Giang	P.Đ.MHH4	1,33 ^c ±0,17 ^B	1,83 ^d ±0,29 ^{AB}	2,67 ^a ±0,30 ^A
	P.DH.MH1	4,00 ^b ±0,11 ^C	6,33 ^c ±0,33 ^B	9,67 ^c ±0,33 ^A
	P.DH.MHH3	8,00 ^a ±0,16 ^C	14,00 ^b ±0,20 ^B	17,67 ^b ±0,33 ^A
	P.DH.MHH6	8,33 ^a ±0,33 ^C	16,33 ^a ±0,33 ^B	19,33 ^a ±0,33 ^A
P		<0,001	<0,001	<0,001
Cần Thơ	P.DH.PĐ1	1,26 ^c ±0,06 ^C	1,66 ^b ±0,07 ^A	2,12 ^a ±0,08 ^B
	P.Đ.CR3	2,32 ^b ±0,14 ^B	2,93 ^a ±0,13 ^B	3,12 ^a ±0,12 ^B
	P.Đ.CĐ3	4,26 ^c ±0,10 ^A	6,90 ^b ±0,34 ^A	10,09 ^a ±0,51 ^A
P		<0,001	<0,001	<0,001

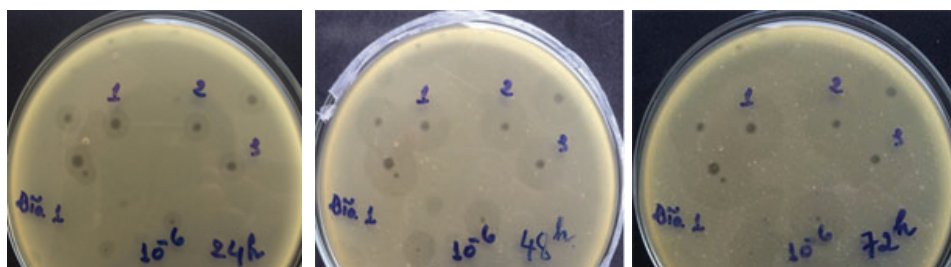
^{a, b, c} những chữ mũ trên cùng một cột giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$)

^{A, B, C} những chữ mũ trên cùng một dòng giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$)

Kết quả kiểm tra đường kính phân giải ở bảng 5 cho thấy, 2 thực khuẩn thể P.DH.MHH3 và P.DH.MHH6 phân lập từ An Giang có khả năng phân giải vi khuẩn *E. coli* E.Đ.BĐ1 cao hơn 2 thực khuẩn thể P.Đ.MHH4 và P.DH.MH1. Ngoài ra, thực khuẩn thể P.DH.MH6 (hình 2) còn được ghi nhận có khả năng phân giải nhiều chủng *E. coli* nhất (23 chủng *E. coli*) trong số 10 thực khuẩn thể phân lập được. Trong tổng số 23 chủng *E. coli* bị phân giải, có một chủng là E.Đ.BĐ4 mang cả 3 gen độc lực *papC*, *iss* và *tsh*.

Đối với các TKT phân lập được tại Tp. Cần Thơ, kết quả ở bảng 5 cho thấy đường kính phân giải của các TKT tăng dần theo thời gian khảo sát từ 24 đến 72 giờ. Nghiên cứu của Wang *et al.* (2006), cũng cho thấy có sự tương quan thuận

giữa kích thước đường kính phân giải của TKT đối với vi khuẩn *E. coli* tăng dần theo thời gian khảo sát từ 24 đến 72 giờ. Kết quả nghiên cứu của Mai Huỳnh Dur An và *ctv.* (2016) cũng chỉ ra rằng đường kính phân giải tăng theo thời gian khi nghiên cứu TKT có khả năng phân giải *E. coli* gây bệnh đường ruột trên gà với đường kính từ 1,56-1,66 mm trong 24-72 giờ. Bên cạnh đó, kết quả ở bảng 5 cho thấy, thực khuẩn thể P.Đ.CĐ3 có khả năng phân giải vi khuẩn *E. coli* E.Đ.CĐ6 cao hơn so với 2 thực khuẩn thể P.DH.PĐ1 và P.Đ.CR3 được thể hiện qua đường kính phân giải sau 24, 48 và 72 giờ. Trước đó, kết quả ở bảng 4 cũng đã chỉ ra rằng thực khuẩn thể P.Đ.CĐ3 có khả năng phân giải các chủng vi khuẩn *E. coli* nhiều nhất với số lượng là 26 chủng trong tổng số 36 chủng.



(a)

(b)

(c)

Hình 2. Vòng vô khuẩn của thực khuẩn thể P.DH.MHH6 tại thời điểm 24 giờ (a), 48 giờ (b) và 72 giờ (c)

Từ các kết quả trên cho thấy, P.DH.MHH6 và P.Đ.CĐ3 là 2 TKT có khả năng thực khuẩn cao nhất trong tất cả các TKT được phân lập ở tỉnh An Giang và Thành phố Cần Thơ. Vì vậy, có thể ứng dụng hai TKT này trong các nghiên cứu điều trị bệnh hô hấp do *E. coli* gây ra trên gà.

IV. KẾT LUẬN

Vi khuẩn *E. coli* hiện diện ở tất cả các mẫu đã phân lập với tỷ lệ cao (100%).

Phân lập được 18 thực khuẩn thể có khả năng phân giải vi khuẩn *E. coli*, chiếm tỷ lệ 25,0%. Trong đó có 8 thực khuẩn thể P.Đ.CĐ3, P.Đ.CĐ6, P.DH.MHH6, P.DH.MH1, P.Đ.MHH3, P.Đ.CR1, P.Đ.CĐ4 và P.Đ.MHH4 có phổ ký chủ rộng với tỷ lệ lần lượt 72,2%, 69,4%, 63,8%, 58,3%, 58,3%, 50%, 44,4% và 33,3%.

Sự hiện diện của các gen độc lực *tsh*, *iss* và *papC* ở các chủng *E. coli* phân lập với tỷ lệ khá cao, lần lượt là 31,9%, 31,9% và 30,6%.

Hai thực khuẩn thể P.DH.MHH6 và P.Đ.CĐ3 có tiềm năng trong việc thử nghiệm khả năng phòng và điều trị bệnh do *E. coli* gây ra trên gà.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự tài trợ của Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số đề tài B2018-TCT-32.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ana, C.G.P. Rocha, Silvio L.S. Rocha, Carlos A.V. Lima-Rosa, Guilherme F. Souza, Hamilton L.S. Moraes, Felipe O. Salle,
- Lucas B. Moraes and Carlos T.P. Salle., 2008. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28(3):183-186.
- Balogh, B., 2002. Strategies of improving the efficacy of bacteriophages for controlling bacterial spot of tomato. A thesis presented to the graduate school of the University of Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. University of Florida, 74p.
- Gross, R.J., Rowe, B., 1985. *Escherichia coli* diarrhoea. *Journal of Hygiene*, 95(3): 531-550.
- Huff, W. E., G.R. Huff, N.C. Rath, J.M. Balog, A.M. Donoghue, 2002. Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02). *Poultry Science*, 81:1486-1491.
- Huỳnh Ngọc Tâm, Lê Uyển Thanh, Trần Thanh Tùng, Thị Diễm, Lưu Thái Danh và Nguyễn Thị Ngọc Nga, 2017. Phân lập và tuyển chọn thực khuẩn thể hiệu quả trong phòng trừ vi khuẩn *Ralstonia Solanacearum* gây bệnh héo xanh trên cây hoa cúc (*Chrysanthemum* sp). *Bệnh hại thực vật Việt Nam*, 89-100.
- Kroppinski, A.M., A. Mazzocco, T.E. Waddell, E. Lingohr and R.P. Johnson, 2009. Enumeration of bacteriophage by

- double agar overlay plaque assay. *Method in molecular biology*, 501: 69-76
7. Mai Huỳnh Dur An, Huỳnh Chí Nghĩa, Bùi Khánh Lâm, Phan Hữu Bằng, Lưu Huỳnh Anh, Nguyễn Thị Thu Nga và Nguyễn Trọng Ngử, 2016. Thử nghiệm khả năng phân giải vi khuẩn *Escherichia coli* của thực khuẩn thể (Bacteriophage) phân lập tại các trại gà thương phẩm. *Tạp chí Nông Nghiệp & Phát triển Nông thôn*, 139-146.
 8. Nguyễn Đức Hiền, 2017. Bệnh truyền nhiễm gia cầm. NXB Trường Đại học Cần Thơ, tr. 39-58.
 9. Nguyễn Bá Hiền, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Lê Văn Lãnh và Đỗ Ngọc Thúy, 2012. Bệnh truyền nhiễm thú y. NXB Đại học Nông nghiệp, tr. 581-590.
 10. Nguyễn Tiến Dũng, 2009. Nghiên cứu phân biệt loài phụ *Salmonella* gây bệnh với các loài phụ khác trong thực phẩm bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Luận án tiến sĩ, chuyên ngành vi sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
 11. Pirisi, A., 2000. "Phage therapy-advance over antibiotic". *Current Science* 90(5):631-633.
 12. Sonal Vishnubhai Chaudhari, Bholenath Pursotambhai Joshi, Dhruv Nitinkumar Desai, Bharat Babubhai Bhandari, Komal Rameshvarlal Choudhary, Aashwina Madhwal, 2017. Isolation and Characterisation of *E.coli* Infection from the Bronchial Plug of Broiler Birds Associated with Respiratory Diseases. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 5(8):334-341.
 13. Sava, R., 1994. Guide to sampling air, water, soil and vegetation for chemical analysis. Environmental monitoring and pest management branch. USA.
 14. Tanji, Y., T. Shimada, M. Yoichi, K. Miyanaaga, K. Hori, H. Unno, 2004. Towards rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64: 270-274.
 15. TCVN 8400:39-2016, 2016. Bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán – Phần 39: Bệnh viêm đường hô hấp mạn tính ở gà.
 16. Van den Bogaard A. E. J. M., N. London and E. E. Stobberingh, 2000. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from The Netherlands (five abattoirs) and Sweden. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45 (5), pp. 663-671.
 17. Wang, I. N., 2006. Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics Society of America* 172:17-26.
- Ngày nhận 13-8-2018
 Ngày phản biện 17-9-2018
 Ngày đăng 1-1-2019