

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* GÂY TIÊU CHẢY Ở THỎ TRÊN ĐỊA BÀN HUYỆN PHÚ VANG, TỈNH THỪA THIÊN - HUẾ

Huỳnh Văn Chương¹, Đặng Thanh Long¹, Lê Thị Lan Phương²,
Lê Đức Thọ², Phan Vũ Hải², Lê Thành Quý²

TÓM TẮT

Tổng số 250 mẫu phân thỏ được thu thập từ các hộ gia đình và trang trại nuôi thỏ ở huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên - Huế được sử dụng để phân lập và xác định đặc tính sinh học của vi khuẩn *E. coli*. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ thỏ bị nhiễm *E. coli* cao nhất là 92,00% thuộc nhóm thỏ 31-45 ngày tuổi và ít nhất (30,00%) ở nhóm thỏ trên 60 ngày tuổi. 100% số chủng *E. coli* phân lập được có khả năng di động, có phản ứng sinh indol, MR dương tính; 100% các chủng lên men đường glucose và lactose. Hình thái và đặc tính sinh vật hoá học của vi khuẩn *E. coli* phân lập được đều mang đặc điểm và phù hợp với những đặc tính điển hình chung của giống *E. coli* được mô tả. Các chủng *E. coli* phân lập được phát hiện thuộc 7 serotype: O103, O157, O158, O169, O44, O125, O153 và mẫn cảm với kháng sinh amoxicillin, amikacin, cefuroxime (95,4%); colistin, streptomycin (86,3%) trong khi đề kháng với doxycycline (90,91%) và bactrim (95,5%). Sử dụng kỹ thuật PCR kiểm tra các gen độc tố của các chủng *E. coli* phân lập đã phát hiện 7 chủng mang gen độc tố, trong đó 4/7 chủng *E. coli* mang gen *eaeA*, *tsh* (57,14%), 2/7 chủng mang gen *stx2* (28,57%), 1/7 chủng mang gen *stx1* (14,28%).

Từ khóa: Thỏ, tiêu chảy, *E. coli*, mẫn cảm kháng sinh, kháng kháng sinh.

Isolation and determining some biological characteristics of *Escherichia coli* caused diarrhea in rabbits in Phu Vang district, Thua Thien - Hue province

Huynh Van Chuong, Dang Thanh Long, Le Thi Lan Phuong,
Le Duc Thao, Phan Vu Hai, Le Thanh Quy

SUMMARY

A total of 250 rabbit fecal samples collected from the rabbit households and farms in Phu Vang district, Thua Thien - Hue province was used to isolate and determine the biological characteristics of *E. coli*. The studied results showed that the infection rate of domestic rabbits with *E. coli* was the highest (92.00%) in the age groups at 31-45 days old and the lowest infection rate of rabbits (30.00%) was in the age group over 60 days old; 100% of the isolates could move, having reaction to create indol, MR (positive); 100% of the isolates were able to ferment glucose and lactose. The morphological and chemical properties of the *E. coli* isolates were similar to *E. coli* and generally fitted the typical *E. coli* characteristics. The isolated *E. coli* strain were found to belong to 7 serotypes: O103, O157, O158, O169, O44, O125, O153 and susceptible to amoxicillin, amikacin, cefuroxime (95.4%); colistin, streptomycin (86.3%) whilst resistant to doxycycline (90.91%) and bactrim (95.5%). Using PCR technique to check for the toxic genes of the isolated *E. coli* strains, as a result there were 7 strains carried the toxic genes, of which 4/7 *E. coli* strains carried the *eaeA*, *tsh* genes (57.14%), 2/7 strains carried the *stx2* gene (28.57%), 1/7 strains carried the *stx1* gene (14.28%).

Keywords: Rabbits, diarrhea, *E. coli*, antibiotic susceptibility, antibiotic resistance.

¹. Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

². Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, tình hình chăn nuôi gia súc, gia cầm ngày càng diễn biến phức tạp đặc biệt là do dịch bệnh trong thời gian qua đã làm giảm đáng kể số đầu gia cầm, gia súc và gây thiệt hại nghiêm trọng đối với ngành chăn nuôi. Do đó, việc lựa chọn loài vật nuôi khác để có thể cung cấp nguồn thực phẩm thay thế trong đó thỏ là động vật gặm nhấm đang được nhiều nhà chăn nuôi quan tâm. Thỏ là loài đẻ nhiều, nhanh lớn, tạo ra nhiều sản phẩm có giá trị cao như: thịt, lông, da. Thỏ là loài ăn cỏ, có thể tận dụng nguồn thức ăn sẵn có, ít tốn chi phí thức ăn cho thỏ. Thịt thỏ có giá trị dinh dưỡng cao. Từ những ưu điểm, người nuôi có thể khai thác để đạt hiệu quả kinh tế cao nhằm cải thiện cuộc sống.

Bên cạnh những ưu điểm đó thì nhiều bệnh đã gây thiệt hại đáng kể cho các trang trại và nông hộ nuôi thỏ. Trong đó có bệnh tiêu chảy ở thỏ là một hội chứng rối loạn tiêu hóa có thể dẫn đến nhiễm trùng thứ phát làm giảm khả năng miễn dịch và tăng tỷ lệ tử vong cao ở thỏ (Yang *et al.*, 2017). Các bệnh đường ruột liên quan đến vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) gây ra thường là vi khuẩn xâm nhập vào đường ruột (Blanco *et al.*, 1996). *E. coli* là một vi sinh vật bình thường trong hệ tiêu hóa thỏ và nó không gây bệnh trực tiếp cho thỏ, nhưng khi thỏ bị stress hoặc bị nhiễm các mầm bệnh khác có thể kích thích sự phát triển vi khuẩn *E. coli* trong ruột dẫn đến phát bệnh (Milon, 1996). Bệnh do *E. coli* thường gặp ở thời kỳ đầu cai sữa là do stress khi cai sữa và thay đổi chế độ ăn uống dẫn đến giảm sức đề kháng và phát sinh bệnh (Bekheet, 1983; Shahin *et al.*, 2011).

Tiêu chảy ở gia súc đã có nhiều tác giả trong nước nghiên cứu và đề cập trên nhiều khía cạnh. Tuy nhiên, hội chứng tiêu chảy ở thỏ do vi khuẩn *E. coli* gây ra còn hạn chế và chưa có nhiều công trình nghiên cứu ở các tỉnh miền Trung, đặc biệt tại tỉnh Thừa Thiên-Huế. Nhằm xác định các triệu chứng lâm sàng chủ yếu và tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy do *E. coli* gây ra ở thỏ. Đồng thời xác định các đặc điểm hình thái và sinh hóa, huyết thanh học, tính miễn cảm của vi khuẩn với kháng

sinh và phát hiện các gen độc lực phổ biến của các chủng *E. coli* đã phân lập làm cơ sở khoa học trong việc phòng trị bệnh một cách có hiệu quả trong chăn nuôi thỏ.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Theo dõi các triệu chứng lâm sàng của thỏ mắc bệnh tiêu chảy
- Phân lập vi khuẩn *E. coli* trong các mẫu phân thỏ mắc bệnh tiêu chảy
- Giám định một số đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *E. coli*
- Xác định serotype O của các chủng *E. coli* phân lập được trên thỏ
- Xác định tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng *E. coli* phân lập
- Xác định các gen độc tố của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập.

2.2. Nguyên liệu nghiên cứu

Môi trường thạch MacConkey, môi trường LB (Luria broth) được sử dụng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn *E. coli* do hãng Merck cung cấp, các hóa chất và dụng cụ khác được cung cấp bởi phòng thí nghiệm. Các serotype được xác định với kháng huyết thanh O chuẩn (hãng Denka Seiken Co. Ltd., Tokyo, Nhật Bản).

Các loại kháng sinh sử dụng trong nghiên cứu gồm amoxicillin (Ac) 10 µg, colistin (Co) 10 µg, gentamycin (Ge) 10 µg, amikacin (Ak) 30 µg, streptomycin (Sm) 10 µg, tetracycline (Te) 30 µg, doxycycline (Dx) 30 µg, ampicillin (Am) 10 µg, sulfamethoxazole/trimethoprim (bactrim) (Bt) 23,75 µg, cefuroxime (Cu) 30 µg và levofloxacin (Lv) 5 µg (Công ty Nam Khoa, Việt Nam).

Phản ứng PCR được thực hiện bằng bộ kit PCR Go Taq® Green Master Mix 2X (Promega, USA), thang chuẩn ADN (Lambda DNA/Hind III), các cặp mồi được tổng hợp bởi công ty Integrated DNA Technologies (USA).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- **Thu mẫu:** Tổng cộng 250 mẫu phân thỏ từ 1-60 và >60 ngày tuổi, có biểu hiện tiêu chảy tại một số trại và nông hộ chăn nuôi thỏ trên địa bàn huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên - Huế. Mẫu phân thỏ được lấy từ trực tràng (bằng tăm bông vô trùng) của những con bị mắc tiêu chảy và chưa điều trị bằng kháng sinh.

- **Khám lâm sàng:** Triệu chứng lâm sàng được xác định bằng phương pháp khám thường quy.

- **Xác định hình thái và đặc tính sinh hóa vi khuẩn E. coli:** Những khuẩn lạc điển hình được phết kính và nhuộm gram để kiểm tra hình thái. Các chủng vi khuẩn E. coli nghi ngờ được kiểm tra các đặc tính sinh hóa của chúng.

- **Xác định cấu trúc kháng nguyên O bằng**

kháng huyết thanh: Các serotype của các chủng E. coli đã phân lập được xác định bằng phản ứng ngưng kết nhanh trên phiến kính (Sojka et al., 1965) với kháng huyết thanh O chuẩn. Với những chủng có ngưng kết với kháng huyết thanh đa giá, tiếp tục thực hiện phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh đơn giá để xác định serotype của vi khuẩn.

- **Kiểm tra sự đề kháng của vi khuẩn E. coli đối với các loại kháng sinh:** dựa trên phương pháp khuếch tán trên thạch theo mô tả của Bauer et al. (1966).

- **Xác định các gen độc tố bằng PCR:** Sự hiện diện của gen mã hóa yếu tố độc lực eaeA, tsh, stx1,2 với các cặp mồi đặc hiệu được trình bày ở bảng 1, chu trình nhiệt cho phản ứng PCR trình bày ở bảng 2.

Bảng 1. Các cặp mồi xác định gen độc tố của vi khuẩn E. coli sử dụng trong phản ứng PCR

Gen	Trình tự mồi 5'-3'	Kích thước phân tử (bp)	Tài liệu tham khảo
eaeA	ATG CTT AGT GCT GGT TTA GG GCC TTC ATC ATT TCG CTT TC	248	Bisi-Johnson et al. (2011)
tsh	AGT CCA GCG TGA TAG TGG AGT CCA GCG TGA TAG TGG	620	Delicato et al. (2003)
stx1	ACACTGGATGATCTCAGTGG CTGAATCCCCCTCCATTATG	641	Dipineto et al. (2006)
stx2	CCATGACAACGGACAGCAGTT CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	779	

Bảng 2. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR

Gen	Nhiệt độ biến tính	Nhiệt độ bắt mồi	Nhiệt độ kéo dài	
eaeA	94°C - 5 phút	51°C - 30 giây	72°C - 30 giây	72°C - 7 phút
tsh	94°C - 5 phút	54°C - 45 giây	72°C - 45 giây	72°C - 10 phút
stx1, 2	94°C - 5 phút	58°C - 45 giây	72°C - 45 giây	72°C - 10 phút

- **Tách chiết DNA tổng số của các chủng vi khuẩn:** Các chủng vi khuẩn được nuôi trên môi trường LB, ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ. Dịch nuôi cấy được ly tâm ở 13.000 vòng/phút ở 4°C để thu tế bào. DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp CTAB (cetyl trimethylammonium bromide): phá vỡ tế bào bằng cách bổ sung 500µL CTAB, 30µL

Sodium dodecyl sulfate 10%, 25µL lysozyme vào ống eppendorf chứa tế bào, vortex, ủ nhiệt ở 70°C trong 30 phút. Kết tủa DNA bằng ethanol 100% và bảo quản trong tủ lạnh ở -20°C trong 60 phút. Kết tủa DNA bằng cách ly tâm 15.000 vòng/phút trong 10 phút và rửa DNA lại 2 lần bằng ethanol 70%. Sau đó, để khô tại nhiệt độ phòng và tái huyền phù

DNA bằng cách cho thêm vào 50 μ L Tris- Ethylene diamine tetraacetic acid. DNA tổng số được điện di kiểm tra trên agarose gel.

- **Xử lý số liệu:** Các số liệu được xử lý bằng phép Chi-Square, sử dụng phần mềm Minitab 16.0 và Microsoft Excel 2010 ở mức ý nghĩa được xử lý thống kê ở độ tin cậy 95% ($p < 0,05$).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả triệu chứng lâm sàng chủ yếu của thỏ mắc bệnh tiêu chảy do *E. coli*

Quan sát các biểu hiện của thỏ khi bị mắc bệnh tiêu chảy, kết quả được ghi chép và tổng hợp ở bảng 3.

Bảng 3. Triệu chứng lâm sàng của thỏ mắc bệnh tiêu chảy

Triệu chứng lâm sàng quan sát được	Số thỏ có biểu hiện (con)	Tỷ lệ (%)
Sốt	130	52,00
Kém ăn	203	81,20
Uống nước nhiều	22,3	89,20
Lười vận động	242	96,80
Lông xù, lông quanh hậu môn và vùng bụng bị thấm bết cả dịch và phân	180	72,00
Phân loãng và thối	214	85,60
Nôn mửa	55	22,00

Trong tổng số 250 thỏ được theo dõi; 96,8% con có biểu hiện lười vận động; 89,2% uống nước nhiều; 52% sốt cao. Ngoài ra, thỏ có biểu hiện giảm ăn, phần bụng căng phồng lên do

chứa đầy khí và nước, lông ở xung quanh hậu môn, chân sau, phần bụng bị bẩn bởi dính nước phân màu vàng, chảy nước dãi, khoang mắt trũng xuống.



Hình 1. Thỏ chết mắc bệnh do tiêu chảy

3.2. Kết quả phân lập vi khuẩn *E. coli* trong các mẫu phân

Kết quả phân lập vi khuẩn *E. coli* từ 250 mẫu

phân thỏ mắc bệnh tiêu chảy ở các lứa tuổi khác nhau tại nông hộ và trang trại. Kết quả được trình bày tại bảng 4.

Bảng 4. Tỷ lệ thỏ mắc tiêu chảy do *E. coli* theo tuổi

Lứa tuổi thỏ (ngày)	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu nhiễm	Tỷ lệ nhiễm (%)
1-15	50	16	32,00
16-30	50	37	74,00
31-45	50	46	92,00
46-60	50	24	48,00
>60	50	15	30,00

Kết quả bảng 4 cho thấy thỏ ở lứa tuổi 31-45 ngày có tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy do *E. coli* cao nhất (92,00%), tiếp đến là lứa tuổi 16-30 ngày với tỷ lệ nhiễm là 74,00% và 48,00% đối với thỏ 46-60 ngày tuổi; 32,00% thỏ ở lứa tuổi 1-15 ngày tuổi và thấp nhất là thỏ ở giai đoạn trên 60 ngày tuổi (30,00%). Điều này có thể do thỏ thường được cai sữa vào giai đoạn 30-45 ngày tuổi nên bị ảnh hưởng của các điều kiện bất lợi như chuồng trại, thức ăn, điều kiện chăm sóc, do đó thỏ thường mắc bệnh với tỷ lệ cao trong giai đoạn này. Đồng thời, thỏ giai đoạn này còn non, yếu nên sức đề kháng cũng như khả năng thích nghi với các điều kiện môi trường kém nên ở giai đoạn này tỷ lệ mắc bệnh của thỏ cao. Bekheet (1983) và Shahin *et al.* (2011) đã cho rằng bệnh *E. coli* ở thỏ thường gặp vào thời kỳ đầu cai sữa hơn là thời kỳ bú sữa mẹ và có thể gặp ở thỏ trưởng thành, nguyên nhân được cho là do stress khi cai sữa và thay đổi chế độ ăn uống dẫn đến giảm sức đề kháng nên thỏ dễ mắc bệnh tiêu chảy.

3.3. Kết quả giám định một số đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *E. coli*

Kiểm tra hình thái bằng phương pháp nhuộm gram và các đặc tính sinh hóa với 45 mẫu trong tổng số 138 mẫu nhiễm vi khuẩn *E. coli* sau khi phân lập được mô tả ở bảng 5.

Bảng 5 cho thấy trên các tiêu bản nhuộm vi khuẩn bắt màu gram âm....., vi khuẩn lên men đường lactose, glucose, không sinh H₂S, không phân giải ure và citrate, phản ứng với thuốc thử methyl red, không phản ứng với Voges proskauer và có khả năng di động. Kết quả xác định hình thái và đặc tính sinh học của vi khuẩn *E. coli*

trong nghiên cứu này là phù hợp với công bố trước đây (Zinnah và cs., 2007).

Bảng 5. Kết quả giám định một số đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ phân thỏ

Thử nghiệm	Kết quả
Glucose	+
Lactose	+
H ₂ S	-
Indol	+
Methyl red	+
Voges proskauer	-
Citrate	-
Phân giải ure	-
Di động	+

Ghi chú: (+): dương tính, (-): âm tính

3.4. Kết quả xác định serotype O của các chủng *E. coli* phân lập được trên thỏ

Xác định độc lực và yếu tố gây bệnh của vi khuẩn *E. coli* là rất cần thiết để chủ động trong công tác phòng trị bệnh ở thỏ. Bằng phương pháp ngưng kết nhanh trên phiến kính, sử dụng kháng huyết thanh chuẩn *E. coli* để xác định các serotype O của vi khuẩn *E. coli* trong 45 mẫu đã được xác định các đặc tính sinh hóa. Kết quả được ghi nhận qua bảng 6.

Kết quả bảng 6 cho thấy đã xác định được serotype của 44 chủng, chưa xác định được serotype của 1 chủng còn lại, các chủng *E. coli* phân lập từ thỏ trong nghiên cứu này chúng tôi thuộc 7 serotype O; trong đó O103, O158 chiếm tỷ lệ cao (20,00%), tiếp đến là O125 chiếm

15,55%; O169, O153 chiếm 13,33%; O44 chiếm 8,89% và O157 chiếm 6,66%. Các serotype khác nhau đã được báo cáo bởi nhiều tác giả như là O111, O114 và O125. Scaletsky *et al.* (1984), Elbakry (2009) đã xác định serotype O44 phổ biến

nhất ở thỏ bị tiêu chảy và Shahin *et al.* (2011) đã phát hiện O44 và O158 là các serotype phổ biến nhất. Mặt khác, Walaa *et al.* (2016) đã xác định các kiểu huyết thanh khác của *E. coli* là O109, O15, O103 và O8.

Bảng 6. Serotype O của vi khuẩn *E. coli* trên thỏ

Serotype	Số chủng xác định kháng nguyên O	Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)
O103	45	9	20,00
O157	45	3	6,66
O158	45	9	20,00
O169	45	6	13,33
O44	45	4	8,89
O125	45	7	15,55
O153	45	6	13,33
Chưa xác định	45	1	-

3.5. Đánh giá tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng *E. coli* phân lập

Vi khuẩn miễn cảm với kháng sinh là nguyên nhân dẫn đến điều trị bệnh kém hiệu quả. Nhiều nghiên cứu cho thấy mức độ miễn cảm của vi khuẩn đối với kháng sinh có sự biến đổi theo các yếu tố không gian và thời gian cũng như đối tượng vật chủ khác nhau ở từng cơ sở chăn nuôi (Adzitey *et al.*, 2013; Berglund, 2015).

Xác định mức độ miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn phân lập tại thực địa được chú trọng và làm cơ sở cho lựa chọn thuốc điều trị phù hợp. Trong nghiên cứu này, 50% số chủng phân lập của mỗi serotype được chọn ngẫu nhiên để kiểm tra miễn cảm với kháng sinh (tổng số 22 chủng được kiểm tra). Kết quả đánh giá tính miễn cảm kháng sinh được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Kết quả kiểm tra tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng *E. coli*

Kháng sinh	Ký hiệu kháng sinh	Số chủng kiểm tra	Miễn cảm		Kháng	
			Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
Ampicillin	Am	22	20	90,9	2	9,1
Amoxicillin	Ac	22	21	95,4	1	4,6
Colistin	Co	22	19	86,3	3	13,7
Gentamycin	Ge	22	13	59,0	9	41,0
Amikacin	Ak	22	21	95,4	1	4,6
Streptomycin	Sm	22	19	86,3	3	13,7
Tetracycline	Te	22	17	77,2	5	22,8
Doxycycline	Dx	22	2	9,09	20	90,91
Sulfamethoxazole/ Trimethoprim (Bactrim)	Bt	22	1	4,5	21	95,5
Cefuroxime	Cu	22	21	95,4	1	4,6
Levofloxacin	Lv	22	16	72,7	6	27,3

Kết quả kiểm tra tính mẫn cảm với kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* phân lập trên thỏ bị bệnh tiêu chảy tại tỉnh Thừa Thiên - Huế cho thấy có 2 kháng sinh có tỷ lệ đề kháng cao là doxycycline (90,91%) và sulfamethoxazole/trimethoprim (95,5%), gentamycin có tỷ lệ đề kháng trung bình (41,0%). Nguyễn Việt Dũng (2011) cho rằng các chủng *E. coli* được thử nghiệm đều kháng mạnh với sulfamethoxazole/trimethoprim (86,67%), doxycillin (83,33%). Những kháng sinh rất nhạy cảm đối với vi khuẩn là amoxicillin, akamicin, cefuroxime (95,4%); colistin, streptomycin (86,3%); mẫn cảm trung bình là tetracycline (77,2%), levofloxacin (72,7%). Nguyễn Việt Dũng (2011) cho rằng các chủng *E. coli* phân lập được đặc biệt mẫn cảm với ceftiofur (100%), akamicin (96,67%), ampicillin (76,67%), enrofloxacin (73,33%) và amoxycilin (70%). Nguyễn Anh Tuấn và Nguyễn Bá Tiếp (2013) khi xác định tính mẫn cảm với một số kháng sinh của các chủng *E. coli* phân lập được trong hội chứng tiêu chảy ở lợn con trước và sau cai sữa cho thấy tỷ lệ kháng với gentamycin là 84,2 % và tetracycline là 100 %. Đoàn Thị Kim Dung (2004) khi thử kháng sinh đồ vi khuẩn *E. coli* cho biết vi khuẩn kháng mạnh với các loại kháng sinh đã được sử dụng rộng rãi như tetracycline (64,0 %), streptomycin (70,7 %) và mẫn cảm mạnh với kháng sinh mới như ceftiofur (98 %). Hiện tượng kháng nhiều loại thuốc kháng sinh ở vi khuẩn là do trong điều trị các nhà chăn nuôi và cán bộ thú y phối hợp nhiều kháng sinh cùng một lúc hay bổ sung kháng sinh vào thức ăn và nước uống hoặc đã sử dụng trong thời gian dài đồng thời sử dụng thuốc không đúng kỹ thuật và gen sản sinh yếu tố kháng thuốc nằm trong plasmid R (Resistance). Plasmid có thể truyền dọc và truyền ngang cho tất cả quần thể thích hợp.

3.6. Kết quả xác định các gen độc lực của vi khuẩn *E. coli* gây bệnh tiêu chảy trên thỏ

Trong các chủng vi khuẩn *E. coli* đã được xác định serotype kháng nguyên O, chúng tôi chọn ra 7 chủng với các đặc điểm điển hình đại diện cho các serotype, các địa điểm lấy mẫu để xác định các yếu tố gây bệnh của vi khuẩn *E. coli*. Trong các loại độc tố của vi khuẩn *E. coli*

gây bệnh ở thỏ, độc tố mã hóa từ gen *eaeA*, *tsh*, *stx1*, *stx2* là các loại độc tố phổ biến có vai trò gây bệnh ở thỏ. Do vậy, việc phát hiện gen mã hóa của các loại độc tố của vi khuẩn như là một chỉ thị về khả năng gây bệnh của vi khuẩn. Kết quả được trình bày ở bảng 8, 9 và hình 2.

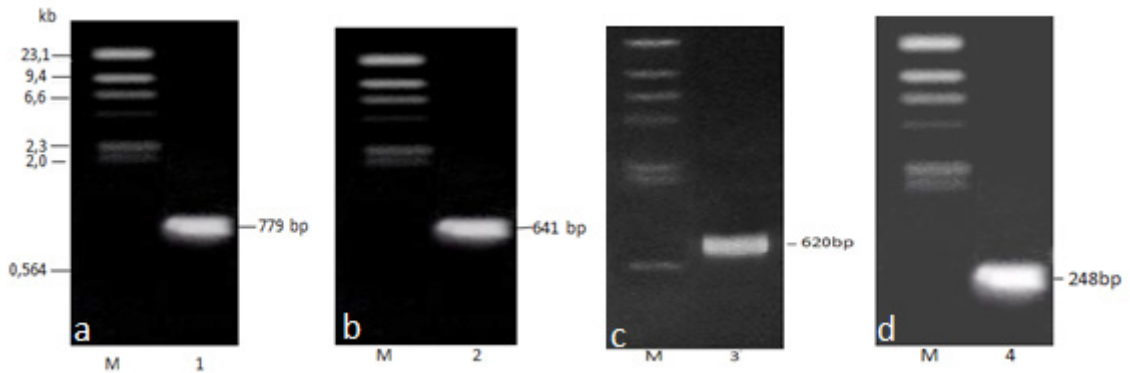
Bảng 8. Kết quả PCR xác định gen mã hóa độc tố ở vi khuẩn *E. coli*

Gen độc tố	Chủng mang gen	Tỷ lệ (%)
<i>eaeA</i>	4/7	57,14
<i>tsh</i>	4/7	57,14
<i>stx1</i>	1/7	14,28
<i>stx2</i>	2/7	28,57

Bảng 9. Kết quả phân phối các gen độc tố có trong các serotype

Serotype	Gen độc tố			
	<i>eaeA</i>	<i>tsh</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
O103	-	-	-	+
O157	+	-	-	-
O158	+	+	-	-
O169	-	+	-	+
O44	-	-	+	-
O125	+	+	-	-
O153	+	+	-	-

Kết quả bảng 8, 9 cho thấy trong 7 chủng *E. coli* phân lập được có 7 chủng mang ít nhất 1 trong 4 gen mã hóa độc tố, trong đó 4 chủng mang gen mã hóa độc tố *eaeA* (57,14%) có mặt ở serotype O157, O158, O125, O153; 4 chủng mang gen mã hóa độc tố *tsh* (57,14%) có mặt ở serotype O158, O169, O125, O153; 2 chủng mang gen mã hóa độc tố *stx2* (28,57%) có mặt ở serotype O103, O169 và 1 chủng serotype O44 mang gen mã hóa độc tố *stx1* (14,28%). Ngeleka *et al.* (2003) đã xác định các gen độc tố *eaeA*, *stx1* là phổ biến ở vi khuẩn *E. coli* gây bệnh tiêu chảy ở thỏ. Pohl *et al.* (1993) và Blanco *et al.* (2006) cho rằng gen độc tố *eaeA* chiếm tỷ lệ cao trong các kiểu huyết thanh được phân lập từ thỏ tiêu chảy. Hassan và Al-Azeem (2009) đã cho rằng 31% các chủng *E. coli* phân lập từ thỏ có mang gen *eaeA*, *stx1*.



Hình 2. Xác định sự hiện diện của các gen độc tố của vi khuẩn *E. coli*

Ghi chú: M: thang chuẩn DNA (*Lambda DNA/Hind III*), 1a: sản phẩm PCR của gen *stx2*, 2b: sản phẩm PCR của gen *stx1*, 3c: sản phẩm PCR của gen *tsh*, 4d: sản phẩm PCR của gen *eaeA*.

Vi khuẩn *E. coli* sau khi phân lập tiến hành tách chiết DNA và thực hiện phản ứng PCR, sản phẩm được điện di trên gel agarose 1% để phát hiện các gen độc tố *eaeA*, *tsh*, *stx1*, *stx2*. Kết quả cho thấy các đoạn gen có kích thước tương ứng lần lượt 248 bp, 620 bp, 641 bp, 779 bp (hình 2).

IV. KẾT LUẬN

Biểu hiện lâm sàng chủ yếu của thỏ mắc bệnh tiêu chảy như lười vận động, uống nước nhiều, giảm ăn hoặc bỏ ăn, phần bụng căng phồng lên do chứa đầy khí và nước, lông ở xung quanh hậu môn, chân sau, phần bụng bị bẩn bởi dính nước phân màu vàng, chảy nước dãi, khoang mắt trũng xuống.

Tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy do *E. coli* của thỏ ở lứa tuổi 31-45 ngày là cao nhất (92,00%), tiếp đến là giai đoạn 16-30 ngày tuổi (74,00%), 46-60 ngày tuổi (48,00%), 1-15 ngày tuổi (32,00%) và thấp nhất là thỏ ở giai đoạn trên 60 ngày tuổi (30,00%).

Đặc điểm hình thái và sinh hóa của các chủng *E. coli* phân lập được từ thỏ bị tiêu chảy là vi khuẩn gram âm, hình que, không phân bào và sắp xếp đơn lẻ hoặc thành cặp, có khả năng di động, có phản ứng sinh indol, MR dương tính; 100 % các chủng đều lên men đường glucose và lactose.

Các chủng *E. coli* phân lập từ thỏ thuộc 7 serotype O. Trong đó O103, O158 chiếm tỷ

lệ cao (20,00%); tiếp đến là O125 (15,55%); O169, O153 (13,33%); O44 (8,89 %) và thấp nhất là O157 (6,66%).

Vi khuẩn *E. coli* gây bệnh tiêu chảy ở thỏ mắc cảm cao với amoxicillin, amikacin, cefuroxime (95,4%); colistin, streptomycin (86,3%) và đề kháng với doxycycline (90,91%) và sulfamethoxazole/trimethoprim (95,5%).

Các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được mang gen độc tố *eaeA*, *tsh* (57,14%), *stx2* (28,57%) và chỉ có 1 chủng mang gen mã hóa độc tố *stx1* (14,28%).

Lời cảm ơn: Xin trân trọng cảm ơn Đại học Huế đã tài trợ cho nghiên cứu này thông qua đề tài khoa học công nghệ cấp Đại học Huế, mã số DHH2019-15-15.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đoàn Thị Kim Dung, 2004. *Sự biến động một số vi khuẩn hiếu khí đường ruột, vai trò vi khuẩn E. coli trong hội chứng tiêu chảy ở lợn con, các phác đồ điều trị*. Luận án tiến sỹ nông nghiệp, Hà Nội.
- Nguyễn Ngọc Dũng, 2011. *Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ, đặc tính gây bệnh của vi khuẩn Escherichia coli trong hội chứng tiêu chảy ở thỏ tại tỉnh Bắc Giang và biện pháp phòng trị*. Luận văn thạc sỹ nông nghiệp, Trường Đại học Thái Nguyên.

3. Nguyễn Anh Tuấn, Nguyễn Bá Tiếp, 2013. Vai trò của *Escherichia coli* và *Salmonella spp.* trong hội chứng tiêu chảy ở lợn con trước và sau cai sữa: nghiên cứu trên mô hình trại nuôi công nghiệp. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, tập III, số 3, 2013, 325.
4. Adzitey, F., Ali, G.R.R., Huda, N. and Ting, S.L., 2013. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Escherichia coli* isolated from ducks in Penang, Malaysia. *International Food Research Journal*, 20(3): 1473 - 1478.
5. Bekheet, A.A., 1983. *Some studies on bacteria causing mortalities on rabbits with special reference to E. coli*. M.V.Sc. Thesis, Fac. Vet. Med. Zagazig Univ.
6. Blanco, M., Blanco, J.E., Bahbi, G., Alonso, M.P., 2006. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int. Microbiol.* 9 :104-110.
7. Bisi-Johnson, M.A., Obi, C.L., Vasaikar, S.D., Baba, K.A. and Hattori, T., 2011. Molecular basis of virulence in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Salmonella* species from a tertiary hospital in the Eastern Cape, South Africa. *Gut Pathogens*. 3-9.
8. Delicato, E.R., de Brito, B.G., Gaziri, L.C.J. and Vidotto, M.C., 2003. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology* 94: 97–103.
9. Dipineto, L., Santaniello, A., Fontanella, M., Lagos, K., Fioretti, A. and Menna, L.F., 2006. Presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in living layer hens. *Letters in Applied Microbiology*. 43: 293–295.
10. El-Bakry, R.M., 2009. *Some studies on bacterial diseases of rabbits*. M.V.Sc, Thesis. Zagazig. University.
11. Hassan, S.A., Abd-Al Azeem, M.W., 2009. Determination of virulence gene markers and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from rabbit in Egypt. *South Valley Vet. Med. Global Veterinaria. J.* 3: 260-267.
12. Milon, A., 1996. Weaned rabbit colibacillosis: a model for study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *6th World rabbit congress, Toulouse*. 3: 1322.
13. Scaletsky, I.C.A., Silva, M.L.M., Trabulsi, L.R., 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *E. coli* to HeLa cells. *Infec. Immun.* 45: 534-536.
14. Shahin, A.M., LebDAH, M.A., Ali, G.R.M., 2011. *Escherichia Coli* as an etiological agent of mucoid enteropathy in rabbits. *Researcher*. 2011. 3(7):8-16.
15. Walaa, F.S., Lamyaa, M.R., 2016. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in suckling rabbits. *Jap. J. Vet. Res.* 64(2): 149-153.
16. Pohl, P.H., Peeters, J.E., Jacquemin, E.R., Lintermans, P.F., Mainil, J.G., 1993. Identification of eae sequences in enteropathogenic *E. coli* strains from rabbits. *Infec. Immun.* 61 (5): 2203 - 2206.
17. Yang, C., Bohao, Z., Yuwei, W., Shuaishuai, H., Lin, M., Cigen, Z., Yulai, P., Xinsheng, W., 2017. Impacts of diarrhea on the immunosystem, intestinal environment, and expression of PGRPs in New Zealand rabbits. *Peerj*. 5: e4100.
18. Zinnah, M.A., Bari, M.R., Islam, M.T., Hossain, M.T., Rahman, M.T., Haque, M.H., Babu, S.A.M., Ruma, R.P., Islam, M.A., 2007. Characterization of *Escherichia coli* isolated from sample. *J. Vet. Med.* 5 (1 & 2): 25–32.

Ngày nhận 26-4-2021

Ngày phản biện 15-5-2021

Ngày đăng 1-3-2022