

## PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA VI KHUẨN Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Ở GÀ NUÔI TẠI HÀ NỘI

Lê Văn Trường, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Đặng Hữu Anh\*, Trần Thị Hương Giang, Trương Quang Lâm

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

\*Tác giả liên hệ: [dhanh@vnua.edu.vn](mailto:dhanh@vnua.edu.vn)

Ngày nhận bài: 17.06.2025

Ngày chấp nhận đăng: 20.04.2026

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục đích phân lập, đánh giá các đặc tính sinh hóa và xác định sự hiện diện của các tổ hợp gen liên quan đến độc lực của vi khuẩn Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) gây bệnh trên đàn gà tại khu vực Hà Nội. Mẫu lách từ gà (100 mẫu) có biểu hiện lâm sàng nghi mắc bệnh đã được thu thập để nuôi cấy định danh thông qua các phản ứng sinh hóa, bộ kit API và kỹ thuật PCR định danh gen *uidA*. Tiếp đó, kỹ thuật multiplex PCR (mPCR) và PCR được sử dụng để khảo sát 8 gen độc lực mục tiêu bao gồm *eaeA*, *tsh*, *fyuA*, *iroN*, *iutA*, *hlyF*, *iss* và *ompT*. Kết quả cho thấy đã xác định được 42/100 mẫu dương tính với *E. coli*, trong đó có 33 chủng (78,6%) được xác nhận là APEC do sở hữu tổ hợp từ 4 đến 7 gen độc lực. Tần suất xuất hiện của các gen độc lực dao động từ 16,7% (*eaeA*) đến cao nhất là 90,5% (*ompT*), đồng thời các chủng này đều thể hiện đặc tính sinh học tương đồng với chủng chuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922. Như vậy, kết quả nghiên cứu khẳng định sự đa dạng về di truyền và vai trò quan trọng của các tổ hợp gen độc lực trong khả năng gây bệnh colibacillosis, tạo cơ sở khoa học cho các nghiên cứu chuyên sâu về phòng trị bệnh.

Từ khóa: Colibacillosis, multiplex PCR, gen độc lực, API.

### Isolation and e Biological Characterisation of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from Chickens in Hanoi

#### ABSTRACT

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) causes colibacillosis in avian species. Virulence-associated genes (VAGs) and pathogenicity islands (PAIs) in APEC play a crucial role in the pathogenicity of this bacterium, leading to severe disease in chickens. In this study, multiplex PCR (mPCR) and PCR reaction were established to identify virulence-associated genes in *Escherichia coli* (*E. coli*), including adhesin-related genes (*eaeA* and *tsh*), iron acquisition genes (*fyuA*, *iroN* and *iutA*), toxin-related gene (*hlyF*) and protectins genes (*iss* and *ompT*). The results showed that 42 out of 100 (42%) samples were positive for *E. coli*. The isolated *E. coli* strains exhibited several biological characteristics, including gram staining, H<sub>2</sub>S production, indole production, urease, catalase and oxidase tests, as well as the fermentation in TSI medium, consistent with previous studies on *E. coli*. When evaluating the frequency of virulence-associated genes in *E. coli*, the *ompT* gene showed the highest frequency at 90.5%, followed by *iutA* (85.7%), *hlyF* (78.6%), *iss* (64.3%), *iroN* (61.9%), *fyuA* (40.5%), *tsh* (23.8%), and *eaeA* (16.7%). Among the 42 APEC strains, 33/42 (78.6%) strains harboured combinations of 4 to 7 virulence-associated genes and were classified as APEC, whereas 9/42 (21.4%) isolates carried only a single virulence gene. The biochemical characteristics observed in the APEC isolates were comparable to those reported for the reference strain *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup>.

Keywords: Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), virulence-associated genes, multiplex PCR (mPCR), chickens.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, ngành chăn nuôi gà đang phải

đối mặt với tình hình dịch bệnh diễn biến rất phức tạp, gây thiệt hại kinh tế rất lớn, trong đó có bệnh do *Escherichia coli* (*E. coli*) gây ra ở gà

(colibacillosis). *E. coli* gây ra các tổn thương đường tiêu hóa và nhiễm trùng máu với các bệnh tích phổ biến như viêm túi khí, viêm dính màng và cơ tim, fibrin bao phủ toàn bộ bề mặt gan, tích nước xoang bụng, áp xe chân, ngoài ra còn có các biểu hiện khác như viêm ống dẫn trứng, viêm ruột, viêm màng não, viêm mô tế bào, viêm tủy xương và viêm khớp cũng có thể gặp phải (Kathayat & cs., 2021; Joseph & cs., 2023). Các chủng APEC đã được phân loại thành ba nhóm độc lực: nhóm độc lực cao, nhóm độc lực trung bình và nhóm độc lực thấp (Johnson & cs., 2008a; Wang & cs., 2015). Gen liên quan đến độc lực của các chủng APEC đã được xác định như *fimC*, *astA*, *papC*, *tsh*, *fyuA*, *iucD*, *Iss*, *hlyF*, *eaeA*, *vat*, *colV*, *stx*, *iutA*... có các vai trò quan trọng khác nhau trong khả năng gây bệnh của *E. coli* trên gà (Janßen & cs., 2001; Kaper & cs., 2004; Ewers & cs., 2005; Rodriguez-Siek & cs., 2005; Johnson & cs., 2008; Kathayat & cs., 2021). Ở Việt Nam, Võ Thành Thìn & cs. (2008a, b) đã phát hiện một số yếu tố độc lực của *E. coli* gây bệnh ở gà bao gồm yếu tố liên quan đến khả năng thu nhận sắt, các gen: *fhuA*, *iutA*, *iron*, *fyuA*, *fepA*, *fhuE*, *cir*, *ireA*, *fecA*, *chuA* và yếu tố liên quan đến bám dính, các gen: *tsh*, gen liên quan kháng nguyên bám dính type 1, kháng nguyên bám dính P. Tuy nhiên, nghiên cứu chưa phân tích đầy đủ các gen độc lực cũng như kiểu kết hợp của gen độc lực trong các chủng APEC gây bệnh nghiêm trọng trên gà. Trong một nghiên cứu khác của tác giả Nguyen & cs. (2021) đã phân lập được 319/449 (71,05%) chủng *E. coli* từ mẫu dịch trực tràng thu thập ở gà nuôi tại Đồng bằng sông Cửu Long. Các chủng vi khuẩn này thuộc các serotype O (bao gồm O1, O2, O18 và O78), nghiên cứu chưa đề cập đến sự hiện diện của các gen độc trong các chủng *E. coli* phân lập được. Vì vậy, việc tìm ra tổ hợp gen đặc trưng liên quan đến độc lực thường xuất hiện của APEC gây bệnh ở gà nuôi tại Việt Nam, cũng như đặc tính sinh học của APEC là cần thiết. Nghiên cứu này phân lập và khảo sát một số đặc điểm sinh học của APEC ở gà nuôi tại Hà Nội, đồng thời xác định sự có mặt của các gen liên quan đến độc lực phục vụ cho các nghiên cứu chuyên

sâu tiếp theo trong công tác phòng chống colibacillosis ở gà.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Phân lập và định danh *Escherichia coli*

Mẫu bệnh phẩm (100 mẫu lách gà ốm và chết với biểu hiện lâm sàng nghi colibacillosis) được thu thập theo QCVN 01-83:2011/BNNPTNT. Mẫu được thu thập tại huyện Đan Phượng, Ba Vì, Hoài Đức và Gia Lâm, Hà Nội từ năm 2023-2024.

Mẫu được nuôi cấy trên đĩa thạch MacConkey (Merck KGaA, Darmstadt, Đức) ở 37°C trong 24 giờ. Khuẩn lạc màu hồng cánh sen, có quang sáng kết tụ bao quanh xuất hiện trên thạch MacConkey được ria vô trùng trên đĩa thạch Eosin Methylene Blue (EMB) (Merck KGaA, Darmstadt, Đức) và nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc đơn lẻ có màu đen, ánh kim loại xuất hiện trên thạch đĩa EMB được chọn lọc, cấy chuyển sang môi trường thạch thường (Nutrient agar, Merck KGaA, Darmstadt, Đức) và môi trường Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth) (Merck KGaA, Darmstadt, Đức) để kiểm tra các đặc tính sinh hóa, bao gồm: nhuộm Gram (Bộ thuốc nhuộm Gram, Merck KGaA, Darmstadt, Đức), phản ứng sinh indole (thuốc thử Kovacs' Indole Reagent, Merck KGaA, Darmstadt, Đức), phản ứng catalase (thuốc thử H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, sản phẩm thương mại), oxidase (N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride, Sigma Aldrich, Mỹ), urease (ure broth base và U40 Supplement, Himedia, Ấn Độ) và lên men đường, sinh hơi, phản ứng sinh H<sub>2</sub>S trong môi trường TSI (Triple Sugar Iron agar, Merck KGaA, Darmstadt, Đức) (da Silva & cs., 2013).

Các chủng *E. coli* phân lập được kiểm tra bằng phản ứng PCR. ADN tổng số được chiết tách bằng phương pháp sốc nhiệt theo quy trình của Ahmed & Dabool (2017) tóm tắt như sau: (i) Ly tâm 1.000µl huyền dịch ở 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C; (ii) Thu cạn và rửa cạn 3 lần bằng PBS 1X; (iii) Bổ sung 200µl nuclease-free water vào ống chứa cạn, ủ ở 100°C/20 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng;

(iv) Vortex và ly tâm huyền phù vi khuẩn với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C; (v) Thu phần nước phía trên chứa ADN, bảo quản ở -86°C cho đến khi sử dụng.

Phản ứng PCR được thực hiện sử dụng cặp mồi bắt cặp gen *uidA* dựa trên nghiên cứu đã được công bố trước đây của Bej & cs. (1991). Trình tự mồi gồm: F2UidAF: 5'-AAAACGG CAAGAAAAGCAG-3' và F2UidAR: 5'-ACGC GTGGTTACAGTCTTGCG-3' với kích thước đoạn gen bắt cặp là 147bp. Phản ứng PCR có sử dụng bộ kit PCR (i-StarMaster, iNtRON Biotech, Korea); với các thành phần của phản ứng PCR (20µl) như sau: 17µl water 3DW + 1µl mỗi xuôi + 1µl mỗi ngược + 1µl ADN mẫu tách chiết. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm 5 giai đoạn tương ứng với cặp mồi như sau: biến tính ban đầu ở 95°C/5 phút; lặp lại 30 chu kỳ (94°C/30 giây, 50°C/1 phút, 72°C/1 phút) và bước kéo dài cuối cùng ở 72°C/6 phút. Chủng APEC đối chứng dương phục vụ phản ứng sinh hóa và PCR đã được phân lập và giám định trước đó, bảo quản tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ sinh học thú y, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, đối chứng âm là nước 3DW.

## 2.2. Phương pháp thực hiện phản ứng multiplex PCR (mPCR) và PCR xác định sự hiện diện của một số gen độc lực (virulence associated genes - VAGs) của *E. coli* ở gà nuôi tại Hà Nội

Các gen độc được lựa chọn để khảo sát và trình tự mồi phát hiện gen được công bố trước đó (Bảng 1) với các thành phần như sau: ADN (100 ng/µl), cặp mồi (10pmol), 10X PCR buffer (2,5mM); MgCl<sub>2</sub> (50mM); 0,4mM dNTP (10mM) (Invitrogen™); 2,5unit Taq ADN polymerase (Quantabio AccuStart II Taq DNA Polymerase); nước PCR. Tổng thể tích cho một mPCR và PCR là 25ul gồm: 5ul ADN (100 ng/µl), 1ul cho mỗi mồi; 2,5ul 10X PCR buffer; 1,25ul MgCl<sub>2</sub>; 1ul dNTP; 0,5ul Taq ADN polymerase; nước PCR đến thể tích cuối cùng là 25ul cho một phản ứng. Chu trình nhiệt của phản ứng mPCR và PCR gồm 5 giai đoạn như sau: tiền biến tính ở

94°C/3 phút 30 giây, lặp lại 35 chu kỳ [94°C/30 giây, Tm/1 phút (cho phản ứng mPCR là 56°C, cho PCR phát hiện gen *ompT* là 54°C, *iutA* là 56°C, *iss* là 57°C), 72°C/1 phút 30 giây] và 6 phút ở 72°C với bước kéo dài cuối cùng. Sản phẩm mPCR, PCR được điện di trên gel agarose 1% có bổ sung thêm 2,5ul ethidium bromide (Merck KGaA, Darmstadt, Đức) với ladder DNA 100bp (Cleaver Scientific, Anh) trong 30 phút, sau đó kiểm tra kết quả trên máy phát tia UV. Chủng APEC đối chứng dương sử dụng cho phản ứng mPCR là chủng sử dụng trong phản ứng PCR định danh *E. coli*, đối chứng âm là nước 3DW. Các chủng *E. coli* sau khi khảo sát dương tính với ít nhất hai gen độc trong 5 gen *ompT*, *iutA*, *iss*, *hlyF* và *iroN* được xác nhận là các chủng APEC (de Oliveira & cs., 2015; Nguyễn Văn Giáp & cs., 2023).

## 2.3. Phương pháp xác định một số đặc tính sinh học cơ bản của vi khuẩn APEC

Các chủng vi khuẩn APEC được lựa chọn để khảo sát đặc tính sinh hóa bằng bộ kit API® 20 E (20100, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Pháp) theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết quả được mã hóa thành hồ sơ số và đối chiếu với cơ sở dữ liệu APIweb™ để xác định đặc tính sinh hóa của vi khuẩn APEC.

## 2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel 2019. Kiểm định Chi-square được sử dụng cho các biến nhị phân với mức ý nghĩa thống kê P < 0,05.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả phân lập và định danh *Escherichia coli*

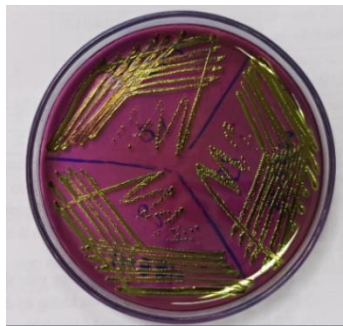
Kết quả cho thấy có 42/100 mẫu (42%) xuất hiện khuẩn lạc nghi ngờ của *E. coli* trên môi trường MacConkey và EMB (Hình 1). Các khuẩn lạc này được thuần khiết, cấy chuyển sang môi trường thạch thường và BHI để giám định các đặc tính sinh hóa cơ bản và thực hiện phản ứng PCR (Hình 1-4).

**Bảng 1. Trình tự mỗi phát hiện gen độc lực của *E. coli***

Các yếu tố độc lực	Gen	Trình tự mỗi (5'-3')	Kích thước (bp)	Tài liệu tham khảo
Yếu tố liên quan khả năng thu nhận sắt	<i>fyuA</i>	F-ACCGTTATCGCCATTCTG R-CTGTGAAGTCTGGGCATTAG	235	Wang & cs. (2015)
Protein Intimin (bám dính và xâm nhập)	<i>eaeA</i>	EaeAF: GACCCGGCACAAGCATAAGC EaeAR: CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	Paton & cs. (1998)
Yếu tố liên quan đến khả năng gây dung huyết	<i>hlyF</i>	F: GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC R: GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	450	Johnson & cs. (2008a)
Yếu tố liên quan khả năng thu nhận sắt	<i>iroN</i>	F: AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT R: GTTCGGGAACCCCTGCTTTGACTTT	553	Johnson & cs. (2008a)
Ngưng kết hồng cầu tổ - mẫn cảm nhiệt độ	<i>tsh</i>	F: ACTATTCTCTGCAGGAAGTC R: CTTCGGATGTTCTGAACGT	824	Ewers & cs. (2004)
Protease màng ngoài dạng episome	<i>ompT</i>	F: TCATCCCAGGAAGCCTCCCTCACTACTAT R: TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	496	Johnson & cs. (2008a)
Tăng khả năng sống sót trong huyết thanh	<i>iss</i>	F: CAGCAACCCGAACCACTTGATG R: AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323	Johnson & cs. (2008a)
Thụ thể siderophore aerobactin	<i>iutA</i>	F: GGC TGG ACA TCA TGG GAA CTGG R: CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG	302	Johnson & cs. (2008a)



(A)



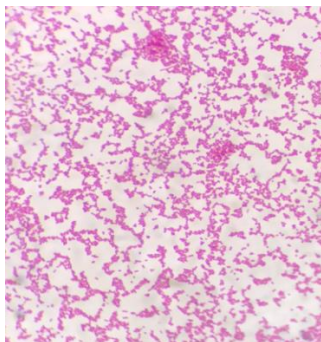
(B)



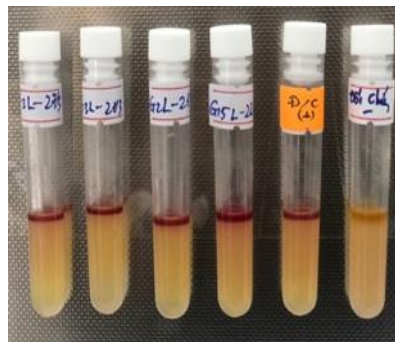
(C)

Ghi chú: (A): Khuẩn lạc của *E. coli* trên môi trường MacConkey có màu hồng cánh sen; (B): Khuẩn lạc của *E. coli* trên môi trường EMB màu đen, ánh kim loại; (C): Khuẩn lạc của *E. coli* trên môi trường thạch thường màu tro trắng nhạt.

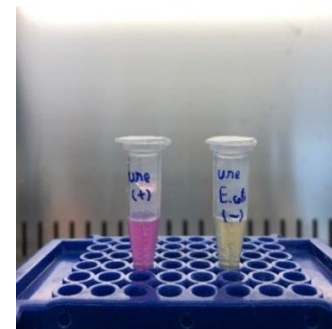
**Hình 1. Kết quả nuôi cấy *E. coli* trên các môi trường**



(A)



(B)

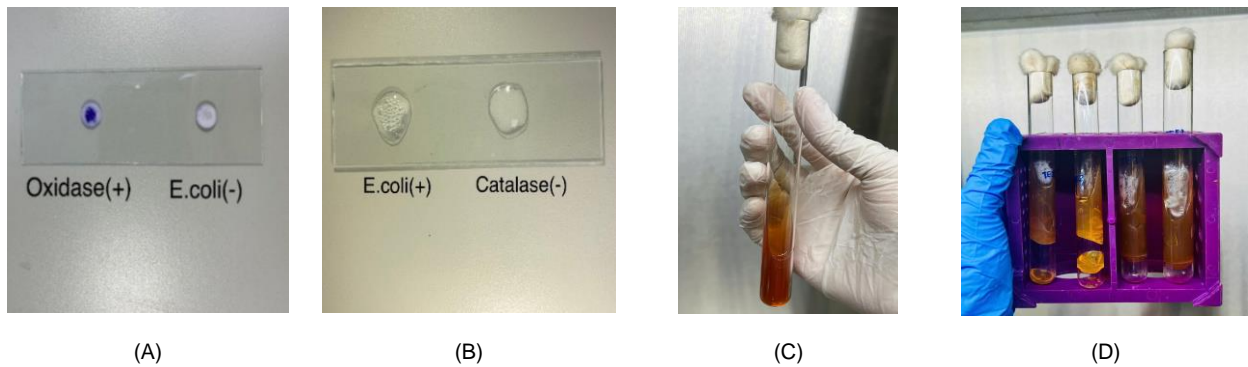


(C)

Ghi chú: (A): Hình thái *E. coli* dưới kính hiển vi quang học; (B): Phản ứng sinh Indol dương tính; (C): Phản ứng Urease âm tính.; (+): Dương tính; (-): Âm tính.

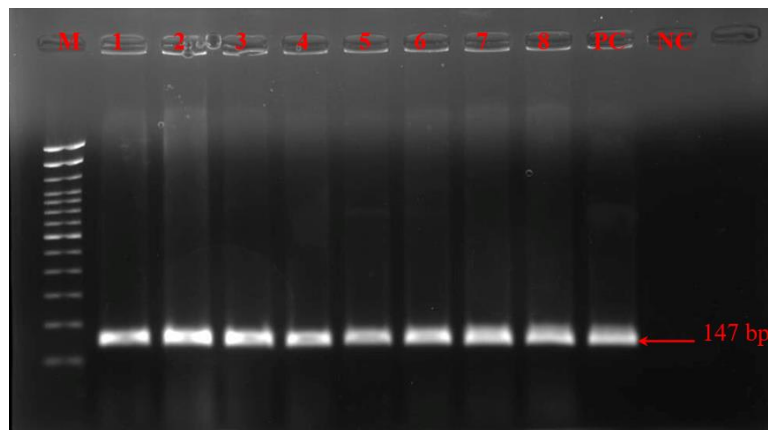
**Hình 2. Một số đặc điểm hình thái và sinh hóa của *E. coli***

Phân lập và khảo sát một số đặc điểm sinh học của vi khuẩn Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) ở gà nuôi tại Hà Nội



Ghi chú: (A): Phản ứng oxidase âm tính; (B): Phản ứng catalase dương tính; (C): Phản ứng lên men đường; (D): Phản ứng sinh  $H_2S$  âm tính; (+): Dương tính; (-): Âm tính.

**Hình 3. Một số kết quả thử phản ứng sinh hóa của *E. coli***



Ghi chú: Giếng M: Maker; Từ giếng 1 đến giếng 8: Sản phẩm PCR của các mẫu nghiên cứu; Giếng NC: Đối chứng âm; Giếng PC: Đối chứng dương.

**Hình 4. Kết quả phản ứng PCR định danh *E. coli*.**

Sau khi giám định các đặc tính sinh hóa cơ bản, tất cả 42 chủng vi khuẩn phân lập được tiếp tục giám định bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi F2UidAF và F2UidAR cho sản phẩm PCR có độ dài là 147bp (Bej & cs., 1991). Kết quả được trình bày ở hình 3 cho thấy, 42 chủng vi khuẩn phân lập đều cho kết quả PCR dương tính, sản phẩm PCR thu được có kích thước là 147bp, giống với đối chứng dương và đúng với kích thước sản phẩm PCR đã được công bố trước đây (Bej & cs., 1991). Trong khi đó, mẫu đối chứng âm không lên vạch, điều này chứng tỏ phản ứng đặc hiệu, có độ tin cậy cao. Các công bố trước đây đã chỉ ra tỷ lệ lưu hành của *E. coli* dao động từ 9,52% đến 36,73% ở tất cả các nhóm tuổi gà (Kathayat & cs., 2021). Tại Việt Nam, Van & cs. (2020) đã tiến hành phân

lập *E. coli* từ các mẫu bệnh phẩm gan, lách của gà bệnh ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long, kết quả khảo sát cho thấy có 14,8% mẫu dương tính với *E. coli*. Tác giả Truong Ha Thai & cs. (2020) cho biết trong tổng số 119 mẫu gan gà mái nghi nhiễm khuẩn colibacillosis từ các trang trại gà ở tỉnh Bắc Ninh, có 76/119 (63,87%) mẫu dương tính với *E. coli*. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ lưu hành của *E. coli* trong các mẫu nghiên cứu cao hơn so với các công bố trên thế giới trước đó của Nguyễn Thị Bích Vân & cs. (2019), Kathayat & cs. (2021) và thấp hơn so với các công bố trong nước trước đó của Trương Hà Thái & cs. (2020). Điều này có thể do sự khác nhau về loại mẫu thu thập trên gà, khu vực địa lý và phương thức chăn nuôi dẫn đến sự sai khác tỷ lệ mắc *E. coli*. Mặt khác gà ốm và chết cũng có thể

đến từ một số nguyên nhân khác, không phải *E. coli* nhưng cũng có một số triệu chứng và bệnh tích tương đồng với colibacillosis do vậy khi phân lập tỷ lệ dương tính với *E. coli* cũng có sự sai khác (Kathayat & cs., 2021).

### 3.2. Kết quả xác định sự xuất hiện một số gen liên quan độc lực của các chủng *E. coli* phân lập ở gà nuôi tại Hà Nội

Phản ứng mPCR được thiết lập với các cặp môi tham khảo dùng để phát hiện các gen độc lực (gen *eaeA*, *tsh*, *fyuA*, *iroN* và *hlyF*) và phản ứng PCR với các cặp môi tham khảo để phát hiện từng gen độc lực (gen *ompT*, *iutA* và *iss*) trên 42 chủng *E. coli* phân lập được (Bảng 2, 3 và hình 5). Kết quả cho thấy tần suất xuất hiện gen *ompT* cao nhất với 90,5% còn thấp nhất là gen *eaeA* (16,7%). Khảo sát sự xuất hiện các tổ hợp gen độc lực cùng xuất hiện trên một chủng *E. coli*, kết quả ở bảng 3 cho thấy có 11 tổ hợp gen xuất hiện trong 42 chủng *E. coli* được khảo sát. Trong đó có 6/42 (14,3%) chủng *E. coli* mang 7 gen độc lực, bao gồm các gen: *hlyF-iroN-fyuA-tsh-ompT-iss-iutA*. Các chủng có tổ hợp chứa 6 gen độc lực bao gồm: 7/42 (16,7%) chủng chứa tổ hợp gen *hlyF-iroN-eaeA-ompT-iss-iutA*, 3/42 (7,1%) chủng mang tổ hợp gen *hlyF-iroN-fyuA-ompT-iss-iutA*, 2/42 (4,8%) mang tổ hợp gen *hlyF-fyuA-tsh-ompT-iss-iutA*. Tiếp theo đó là các chủng *E. coli* mang tổ hợp chứa 5 gen độc lực bao gồm: 1/42 (2,4%) chủng *E. coli* mang tổ hợp gen *hlyF-iroN-fyuA-iss-iutA*, 2/42 (4,8%) mang tổ hợp gen *hlyF-fyuA-tsh-ompT-iutA*, 3/42 (7,1%) chủng mang tổ hợp gen *hlyF-fyuA-ompT-iss-iutA*, 5/42 (11,9%) chủng mang tổ hợp

gen *hlyF-iroN-ompT-iss-iutA*. 4/42 (9,5%) chủng mang tổ hợp 4 gen *hlyF-iroN-ompT-iutA*. Còn lại là các chủng *E. coli* mang một trong hai gen độc lực *ompT* hoặc *iutA*.

Võ Thành Thìn & cs. (2008a) đã công bố tỷ lệ các chủng vi khuẩn mang gen *iutA*, *iron*, *fyuA*, lần lượt là 90%, 75% và 25%. Ngoài ra khi nghiên cứu về một số yếu tố độc lực của các chủng *E. coli* gây bệnh phân lập được ở gà có 15/96 chủng (15,63%) mang gen *tsh* (Võ Thành Thìn & cs., 2008b). Theo nghiên cứu của Jeong & cs. (2012) thực hiện tại Hàn Quốc cho thấy gen *iroN* có tỷ lệ xuất hiện cao nhất 100%, tiếp theo là các gen *hlyF*, *tsh*, *fyuA*, với tỷ lệ lần lượt là 87,1%; 61,4%; 44,6%. Tổng hợp các nghiên cứu trước đây cho thấy tần suất xuất hiện của các gen liên quan đến độc lực trong các chủng APEC lần lượt tương ứng là: *ompT* (67,2% ~ 100%), *iutA* (79,5% ~ 93,1%), *hlyF* (59,3 ~ 100%), *iss* (55,6% ~ 100%), *iroN* (67,88 ~ 100%), *fyuA* (41,9 ~ 77,8%), *eaeA* (1,28%), *tsh* (49,96 ~ 61,8%) (Ewers & cs., 2005; Rodriguez-Siek & cs., 2005; Johnson & cs., 2008a; Johnson & cs., 2008b; Jeong & cs., 2012; Wang & cs., 2015; Jamshidi & cs., 2016; Subedi & cs., 2018; Kim & cs., 2020; Afayibo & cs., 2022; Awawdeh & cs., 2024). So sánh với các kết quả đã được công bố trước đó, tần suất của các gen *ompT*, *iutA*, *iss*, *hlyF* trong nghiên cứu này cũng tương tự. Ngược lại tần suất của các gen *tsh*, *fyuA* và gen *iroN* thấp hơn và tần suất của gen *eaeA* cao hơn. Điều này có thể do sự đa dạng về sự lưu hành các chủng *E. coli* ở các khu vực khác nhau sẽ có tần suất xuất hiện các gen độc khác nhau (Kathayat & cs., 2021; Joseph & cs., 2023).

**Bảng 2. Kết quả xác định sự xuất hiện một số gen độc lực của các chủng *E. coli* phân lập được (n = 42)**

Gen độc lực	Số chủng dương tính với gen độc lực	Tỷ lệ (%)
<i>ompT</i>	38	90,5
<i>iutA</i>	36	85,7
<i>hlyF</i>	33	78,6
<i>iss</i>	27	64,3
<i>iroN</i>	26	61,9
<i>fyuA</i>	17	40,5
<i>tsh</i>	10	23,8
<i>eaeA</i>	7	16,7

**Bảng 3. Kết quả xác định các tổ hợp gen độc lực của các chủng *E. coli* phân lập được (n = 42)**

Kiểu tổ hợp gen	Số gen độc có trong một chủng <i>E. coli</i>	Số chủng <i>E. coli</i> dương tính với các gen độc lực	Tỷ lệ (%)	Các tổ hợp gen độc lực của <i>E. coli</i>							
				<i>hlyF</i>	<i>iroN</i>	<i>fyuA</i>	<i>tsh</i>	<i>eaeA</i>	<i>ompT</i>	<i>iss</i>	<i>iutA</i>
HN 1	7	6	14,3	+	+	+	+	-	+	+	+
HN 2	6	7	16,7	+	+	-	-	+	+	+	+
HN 3	6	3	7,1	+	+	+	-	-	+	+	+
HN 4	5	1	2,4	+	+	+	-	-	-	+	+
HN 5	6	2	4,8	+	-	+	+	-	+	+	+
HN 6	5	2	4,8	+	-	+	+	-	+	-	+
HN 7	5	3	7,1	+	-	+	-	-	+	+	+
HN 8	5	5	11,9	+	+	-	-	-	+	+	+
HN 9	4	4	9,5	+	+	-	-	-	+	-	+
HN 10	1	6	14,3	-	-	-	-	-	+	-	-
HN 11	1	3	7,1	-	-	-	-	-	-	-	+

Ghi chú: (-): Âm tính với gen liên quan độc lực, (+): Dương tính với gen liên quan độc lực.

Việc phân loại một chủng *E. coli* thuộc nhóm Avian pathogenic *E. coli* (APEC) vẫn còn nhiều tranh luận, cách tiếp cận đa tiêu chí, kết hợp giữa vị trí thu thập mẫu phân lập và đặc điểm di truyền liên quan đến độc lực để phân loại ngày càng được xem là phù hợp và có giá trị thực tiễn cao (Kathayat & cs., 2021; Joseph & cs., 2023). Vị trí phân lập đóng vai trò quan trọng trong phản ánh khả năng gây bệnh của APEC. *E. coli* hiện diện ở các nội quan ngoài đường tiêu hóa, đặc biệt là gan và lách của gà, cho thấy vi khuẩn đã vượt qua hàng rào biểu mô, né tránh cơ chế phòng vệ của gan và vào lách. *E. coli* có ở lách, cơ quan lympho ngoại vi quan trọng, được xem là chỉ dấu sinh học mạnh phản ánh khả năng gây bệnh của APEC (Nakamura & cs., 1985). Bên cạnh đó, vi khuẩn APEC thường mang một tập hợp các gen độc lực liên quan đến khả năng gây bệnh (Ewers & cs., 2005; Johnson & cs., 2008a). Một số gen liên quan đến độc lực được xem là quan trọng trong cơ chế gây bệnh của APEC gồm: gen bám dính P-fimbriae (*papC*), gen aerobactin (*iucD*), gen hemagglutinin nhạy cảm với nhiệt độ (Temperature-sensitive hemagglutinin gene - *tsh*), gen độc tố (Toxin gen - *vat*), gen độc tố bền nhiệt đường ruột (Enterotoxin - *astA*), gen tăng khả năng sống sót

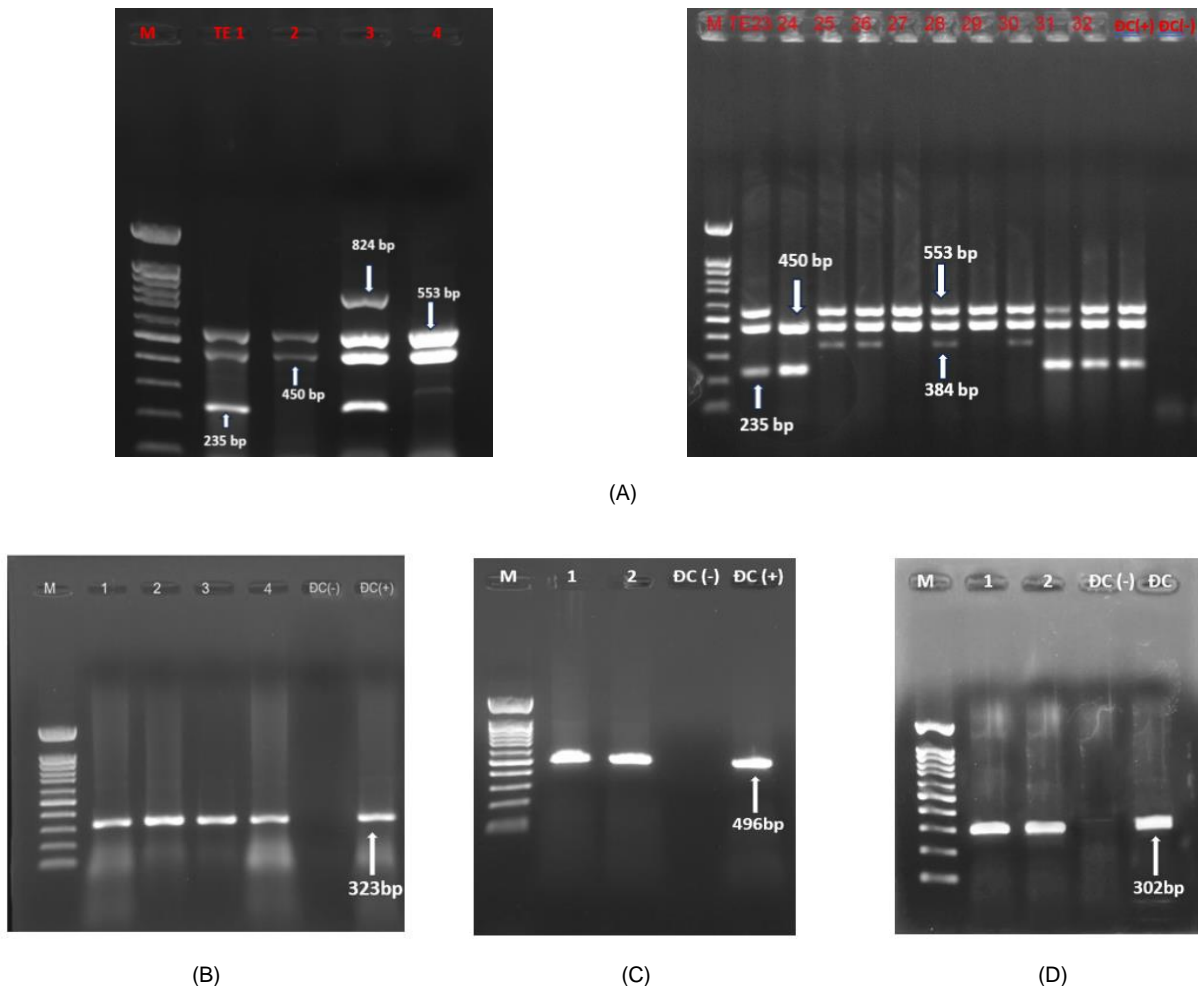
trong huyết thanh (Increased serum survival gene - *iss*) và các gen trong operon của plasmid colicin V (*cva/cvi*) (Ewers & cs., 2005). Một nghiên cứu khác của Johnson & cs. (2008a) cho thấy năm gen độc lực mang trên plasmid gồm *hlyF*, *ompT*, *iroN*, *iss* và *iutA* là các gen xuất hiện phổ biến nhất trong các chủng APEC và có liên quan chặt chẽ đến các chủng *E. coli* gây bệnh cao ở gia cầm. Thử nghiệm trên gà con 1 ngày tuổi cho thấy các chủng APEC mang ít hơn 2 gen thuộc nhóm 5 gen trên hiếm khi gây bệnh, trong khi đa số chủng APEC gây bệnh có từ 2 gen trở lên (de Oliveira & cs., 2015). Nghiên cứu của chúng tôi tiến hành thu thập mẫu lách của gà bệnh và ốm có các biểu hiện lâm sàng nghi colibacillosis để phân lập, khảo sát đặc tính sinh học cũng như phát hiện các gen độc lực của *E. coli* theo khuyến cáo của Johnson & cs. (2008a). Kết quả cho thấy, có 33/42 (78,6%) chủng *E. coli* phân lập được trong nghiên cứu này mang các tổ hợp từ 4 đến 7 gen độc trong đó có chứa từ 3 đến 5 gen theo khuyến cáo của Johnson & cs. (2008a) có liên quan đến tăng khả năng gây bệnh của *E. coli* trên gà, các chủng này được xác định là các chủng APEC (de Oliveira & cs., 2015; Nguyễn Văn Giáp & cs., 2023). Tuy nhiên, các chủng APEC còn có rất nhiều gen liên quan đến độc lực khác đã được

xác định như gen: *fimC*, *astA*, *papC*, *iucD*, *vat*, *colV*, *hlyA*... (Wang & cs., 2015; Kathayat & cs., 2021; Joseph & cs., 2023). Do vậy, cần có những nghiên cứu tiếp theo để xác định sự có mặt các gen độc lực khác của các chủng APEC phân lập được ngoài 8 gen được khảo sát trong nghiên cứu này. Từ đó có thể xác định được sự đa dạng trong các kiểu gen độc lực của APEC, đồng thời làm căn cứ cho các nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo.

### 3.3. Kết quả khảo sát một số đặc tính sinh học cơ bản của vi khuẩn APEC

Kết quả thử phản ứng sinh hóa bằng bộ kit API 20 E cho thấy, cả 33 chủng APEC khảo sát

đều thể hiện đặc điểm sinh hóa phù hợp với mô tả của chủng *Escherichia coli* ATCC 25922™ trong khuyến cáo của nhà sản xuất. Các chủng APEC có kết quả thử phản ứng sinh hóa điển hình như: ONPG ( $\beta$ -galactosidase)+, ADH (Arginine dihydrolase)-, LDC (Lysine decarboxylase) +, ODC (Ornithine decarboxylase) +, CIT (Sử dụng citrate)-, H<sub>2</sub>S (Sinh H<sub>2</sub>S)-, URE (Urease)-, TDA (Tryptophan deaminase)-, IND (Sinh indole) +, VP (Voges-Proskauer)-, GEL (Gelatinase)-, NO<sub>2</sub>+ . Lên men đường GLU (glucose), MAN (mannitol), SOR (sorbitol), RHA (rhamnose), ARA (arabinose), MEL (melibiose), không lên men đường INO (inositol), SAC (saccharose), AMY (amygdalin) (Hình 6).



Ghi chú: Giếng M: Maker với thang chuẩn 100bp, giếng DC (-): đối chứng âm, giếng DC (+): đối chứng dương, các giếng còn lại là sản phẩm PCR của các mẫu nghiên cứu với các gen dương tính, (A): *fyuA* (235bp), *eaeA* (384bp), *hlyF* (450bp), *iroN* (553bp), *tsh* (824bp), (B): *iss* (323bp), (C): *ompT* (496bp), (D): *iutA* (302bp).

**Hình 5. Phát hiện các gen liên quan đến độc lực của *E. coli* bằng mPCR và PCR**

Phân lập và khảo sát một số đặc điểm sinh học của vi khuẩn Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) ở gà nuôi tại Hà Nội



(A)



(B)

Ghi chú: (A): Kit API® 20 E ban đầu sau khi nhỏ huyền phù vi khuẩn APEC vào các giếng, (B): Kit API® 20 E sau khi nuôi cấy vi khuẩn APEC ở 37°C/18 giờ.

**Hình 6. Đặc điểm sinh hóa điển hình của các chủng APEC trên bộ kit API 20E**

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xác định được vi khuẩn *E. coli* là tác nhân gây ra colibacillosis ở gà tại Hà Nội với tỷ lệ mẫu dương tính lên đến 42/100 (42%). Tần suất phát hiện vi khuẩn *E. coli* mang gen độc lực *ompT* (90,5%), *iutA* (85,7%), *hlyF* (78,6%), *iss* (64,3%), *iroN* (61,9%), *fyuA* (40,5%), *tsh* (23,8%), *eaeA* (16,7%). Trong đó một tỷ lệ lớn 33/42 (78,6%) các chủng mang tổ hợp từ 4-7 gen độc lực được xác nhận là các chủng APEC. Kết quả này cho thấy có sự đa dạng di truyền của các chủng APEC phân lập được. Do vi khuẩn APEC còn có rất nhiều gen liên quan đến độc lực khác đã được xác định, nên cần có các nghiên cứu tiếp theo để khảo sát thêm sự có mặt của các gen độc lực khác cũng như xác định các serotype của các chủng APEC làm cơ sở cho các nghiên cứu phục vụ công tác phòng trị bệnh.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Afayibo D.J.A., Zhu H., Zhang B., Yao L., Abdelgawad H.A., Tian M., Qi J., Liu Y. & Wang S. (2022). Isolation, Molecular Characterisation, and Antibiotic

Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* in Eastern China. *Vet Sci.* 9(7): 319.

Ahmed O.B. & Dabool A.S. (2017). Quality Improvement of the DNA extracted by boiling method in Gram negative bacteria. *International Journal of Bioassays.* 6: 5347-5349.

Awawdeh L., Forrest R., Turni C., Cobbold R., Henning J. & Gibson J. (2024). Virulence-associated genes in faecal and clinical *Escherichia coli* isolates cultured from broiler chickens in Australia. *Aust Vet J.* 102(8): 398-406.

Bej A.K., DiCesare J.L., Haff L. & Atlas R.M. (1991). Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Appl Environ Microbiol.* 57(4): 1013-7.

Bộ NN&PTNT (2011). Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia mã số QCVN 01 - 83: 2011/BNNPTNT: Bệnh động vật - yêu cầu chung lấy mẫu bệnh phẩm, bảo quản và vận chuyển. Truy cập từ <https://cucthuy.gov.vn/tieu-chuan-quy-chuan/-/standards/detail/77582> ngày 28/02/2023.

da Silva N., Hirotomi Taniwaki M., Junqueira V.C., Silveira N., do Nascimento M.D.S. & Romeiro Gomes R.A. (2013). *Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual* (1st ed.). CRC Press.

de Oliveira A.L., Rocha D.A., Finkler F., De Moraes L.B., Barbieri N.L., Pavanelo D.B., Winkler C., Grassotti T.T., De Brito K.C., De Brito B.G. &

- Horn F. (2015). Prevalence of ColV plasmidlinked genes and *in vivo* pathogenicity of avian strains of *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis.* 12(8): 679-85.
- Ewers C., Janssen T., Kiessling S., Philipp H.C. & Wieler L.H. (2005). Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 49(2): 269-73.
- Jamshidi A., Razmyar J. & Fallah N. (2016). Detection of *eaeA*, *hlyA*, *stx1* and *stx2* genes in pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers affected with colibacillosis. *IJVM.* 10(2): 97-103.
- Jeong Y.W., Kim T.E., Kim J.H. & Kwon H.J. (2012). Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea. *J Vet Sci.* 13(2): 145-52.
- Johnson T.J., Wannemuehler Y., Doetkott C., Johnson S.J., Rosenberger S.C. & Nolan L.K. (2008a). Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J Clin Microbiol.* 46(12): 3987-96.
- Johnson T.J., Wannemuehler Y., Johnson S.J., Stell A.L., Doetkott C., Johnson J.R., Kim K.S., Spanjaard L. & Nolan, L.K. (2008b). Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 74(22): 7043-50.
- Joseph J., Zhang L., Adhikari P., Evans J.D & Ramachandran R. (2023). Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) in Broiler Breeders: An Overview. *Pathogens.* 12(11): 1280.
- Kaper J.B., Nataro J.P. & Mobley H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2(2):123-40.
- Kathayat D., Lokesh D., Ranjit S. & Rajashekara G. (2021). Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies. *Pathogens.* 10(4): 467.
- Kim Y.B., Yoon M.Y., Ha J.S., Seo K.W., Noh E.B., Son S.H. & Lee Y.J. (2020). Molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis. *Poult Sci.* 99(2): 1088-1095.
- Nakamura K., Maeda M., Imada Y., Imada T & Sato K. (1985). Pathology of spontaneous colibacillosis in a broiler flock. *Vet Pathol.* 22(6): 592-7.
- Nguyen L.T., Thuan N.K., Tam N.T., Huyen Trang C.T., Khanh N.P., Bích T.N., Taniguchi T., Hayashidani H & Lien Khai L.T. (2021). Prevalence and Genetic Relationship of Predominant *Escherichia coli* Serotypes Isolated from Poultry, Wild Animals, and Environment in the Mekong Delta, Vietnam. *Vet Med Int.*
- Nguyễn Văn Giáp, Nguyễn Thành Trung, Tô Như Tường, Trương Hà Thái, Chu Thị Thanh Hương, Đặng Hữu Anh, Mai Thị Ngân, Trần Thị Hương Giang, Lê Văn Trường, Vũ Thị Ngọc, Cao Thị Bích Phượng & Huỳnh Thị Mỹ Lệ (2023). Nghiên cứu hiện tượng đồng nhiễm một số mầm bệnh ở gà có triệu chứng bệnh hô hấp. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.* 21(9): 1091-1098.
- Paton A.W. & Paton J.C. (1998). Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb<sub>0111</sub>*, and *rfb<sub>0157</sub>*. *J Clin Microbiol.* 36(2): 598-602.
- Rodriguez-Siek K.E., Giddings C.W., Doetkott C., Johnson T.J. & Nolan L.K. (2005). Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res.* 36(2): 241-256.
- Subedi M., Luitel H., Devkota B., Bhattarai R.K., Phuyal S., Panthi P., Shrestha A. & Chaudhary D.K. (2018). Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. *BMC Vet Res.* 14(1): 113.
- Truong Ha Thai., Chu Thi Thanh Huong., Vu Thi Thu Tra., Cam Thi Thu Ha & Truong Lan Oanh. (2020). Antimicrobial resistance patterns of escherichia coli isolated from hens with clinical signs of colibacillosis in bac ninh province, Vietnam. *Journal of Agriculture and Technology Management (JATM).* 22(2): 9-12.
- Van N.T.B., Yen N.T.P., Nhung N.T., Cuong N.V., Kiet B.T., Hoang N.V., Hien V.B., Chansiripornchai N., Choisy M., Ribas A., Campbell J., Thwaites G. & Carrique-Mas J. (2020). Characterization of viral, bacterial, and parasitic causes of disease in small-scale chicken flocks in the Mekong Delta of Vietnam. *Poult Sci.* 99(2): 783-790.
- Võ Thành Thìn, Ellen Ons, Nguyễn Việt Không & Bruno Goddeeris. (2008a). Ứng dụng phương pháp Multiplex PCR để phát hiện khả năng tranh giành sắt của vi khuẩn *E. coli* gây bệnh ở gà. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật thú y.* XV(4): 60-65.
- Võ Thành Thìn, Ellen Ons & Bruno Goddeeris. (2008b). Một số yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn *E. coli* gây bệnh ở gà nuôi tại Khánh Hòa và Phú Yên. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật thú y.* XV(6): 38-43.
- Wang J., Tang P., Tan D., Wang L., Zhang S., Qiu Y., Dong R., Liu W., Huang J., Chen T., Ren J., Li C. & Liu H. (2015). The Pathogenicity of Chicken Pathogenic *Escherichia coli* Is Associated with the Numbers and Combination Patterns of Virulence-Associated Genes. *Open Journal of Veterinary Medicine.* (5): 243-254.