

XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN LOÀI CẦU TRÙNG TRÊN GÀ NỒI LAI NUÔI BÁN CHĂN THẢ TẠI TỈNH BẾN TRE BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH DANH PHÂN LOẠI THƯỜNG QUY VÀ PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ

Nguyễn Hồ Bảo Trân¹, Nguyễn Hữu Hưng^{1*}

TÓM TẮT

Mục tiêu nghiên cứu nhằm khảo sát tỷ lệ lưu hành và định danh các loài cầu trùng trên đàn gà nòi lai nuôi thả vườn tại địa bàn tỉnh Bến Tre bằng phương pháp thường quy và phương pháp sinh học phân tử. Qua thu thập và phân tích 1.440 mẫu phân gà từ 1 tuần tuổi đến 12 tuần tuổi, kết quả cho thấy đàn gà nhiễm cầu trùng với tỷ lệ khá cao, chiếm 44,79%. Ở tuần tuổi thứ 3 gà mới bắt đầu nhiễm noãn nang cầu trùng (25%). Tỷ lệ nhiễm tăng vọt ở gà 6 tuần tuổi với 100% gà nhiễm. Tỷ lệ này giảm vào tuần kế tiếp với 92,50%. Tỷ lệ nhiễm thấp nhất được ghi nhận ở gà 12 tuần tuổi, chiếm 10%. Cường độ nhiễm ở mức 4(+) và 3(+) cao nhất tương ứng với thời điểm gà nhiễm cầu trùng nặng ở tuần tuổi thứ 6 (84,17%) và tuần tuổi thứ 7 (12,61%). Gà nòi lai thả vườn tại tỉnh Bến Tre nhiễm 4 loài cầu trùng là: *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. maxima*. Trong đó loài *E. tenella* phổ biến nhất (93,02%), sau đó là *E. maxima* (57,83%), *E. acervulina* (25,58%) và thấp nhất là *E. mitis* (10,64%). Tỷ lệ nhiễm ghép 3 loài noãn nang cầu trùng là phổ biến nhất (33,18%) và thấp nhất là nhiễm ghép 4 loài (15,35%). Thu thập noãn nang cầu trùng ở mẫu phân có cường độ nhiễm 4(+), sau đó ly trích DNA và định danh bằng phương pháp sinh học phân tử với 5 đoạn mỗi của: *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. mitis*. Kết quả cho thấy đàn gà ở tuần tuổi từ thứ 5 đến thứ 7 nhiễm 4 loài cầu trùng: *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. maxima*. Bước đầu giải trình tự gene phát hiện được 2 loài là *E. tenella* và *E. acervulina* có độ tương đồng cao tương ứng 96,61% và 97,78% so với dữ liệu cơ sở của Ngân hàng gene trên NCBI.

Từ khóa: Gà nòi lai, giải trình tự, cầu trùng, PCR, tỉnh Bến Tre.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, chăn nuôi gia cầm đã có những bước phát triển nhanh. Từ chăn nuôi phân tán, quy mô nhỏ, tự phát, dần dần chuyển thành chăn nuôi tập trung với quy mô lớn hơn đã góp phần thay đổi cơ cấu các ngành sản xuất trong nông nghiệp, thúc đẩy phát triển kinh tế và tạo công ăn việc làm cho hàng triệu người, ổn định cuộc sống. Tuy nhiên, ngành chăn nuôi gia cầm trong những năm qua phải đối mặt với nhiều khó khăn và thách thức. Dù chăn nuôi theo phương thức nào thì vấn đề dịch bệnh thường xuyên xảy ra làm thiệt hại và hạn chế sự phát triển của ngành chăn nuôi, trong đó bệnh cầu trùng gà (Coccidiosis) là căn bệnh phổ biến và gây thiệt hại kinh tế nặng nề. Theo Van Meirhaeghe H *et al.* (2014) [8], bệnh cầu trùng gây thiệt hại đến 7 tỷ Euro cho ngành chăn nuôi gia cầm. Bệnh gây ra những tổn thương biểu mô ruột, ảnh hưởng đến sự tiêu hóa và hấp thu dưỡng chất, gây mất nước, mất

máu, tiêu chảy và tăng tính miễn cảm với những tác nhân gây bệnh khác. Ngoài ra chúng còn làm giảm sản lượng trứng ở gà đẻ lên đến 50% và tỷ lệ chết 100% đối với gà không phòng và điều trị bệnh kịp thời (Calnek *et al.*, 1997) [1].

Tỉnh Bến Tre đang chú trọng phát triển chăn nuôi gà theo hình thức nuôi gà bán chăn thả và sử dụng giống gà nòi lai địa phương vì có giá cả ổn định, phù hợp với thị hiếu, ít tiêu tốn công chăm sóc và cơ sở vật chất, mang lại hiệu quả kinh tế cao cho nhà chăn nuôi. Tuy nhiên, do nuôi thả vườn nên gà chịu nhiều ảnh hưởng của điều kiện tự nhiên và mầm bệnh bên ngoài môi trường dễ dàng xâm nhập vào gây bệnh. Trong đó bệnh cầu trùng gà thường xuyên xuất hiện, nguy hiểm hơn là gây nhiễm kế phát các bệnh khác làm cho tình hình nhiễm bệnh càng trầm trọng và gây nhiều tổn thất về kinh tế. Do đó, để có biện pháp phòng trị kịp thời và hiệu quả thì việc chẩn đoán phát hiện gà mắc bệnh cầu trùng một cách chính xác và nhanh chóng là điều rất cần thiết.

¹ Trường Đại học Cần Thơ

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 1 đến tháng 12 năm 2019. Mẫu được thu thập từ 3 trại nuôi gà nòi bán chăn thả ở tỉnh Bến Tre. Địa điểm xét nghiệm mẫu: Phòng thí nghiệm Ký sinh trùng, Bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp và Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phú Sa giải trình tự gene. Số liệu được phân tích theo phương pháp thống kê sinh học trên phần mềm MINITAB ver. 16.0

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện với các phương pháp phù nổi Willis tìm noãn nang cầu trùng, phương pháp đếm trứng Mac-Master, phương pháp định danh phân loại cầu trùng gà thường quy của Eckert (1995) [2] dựa vào đặc điểm như: hình dáng, màu sắc của noãn nang, thời gian hình thành bào tử để xác định loài cầu trùng. Phương pháp định danh cầu trùng gà bằng sinh học phân tử được tiến hành từ các mẫu ở giai đoạn gà 5 tuần tuổi đến 7 tuần tuổi, chọn các mẫu có cường độ nhiễm 4(+) để tiến hành, tách chiết DNA, thực hiện phản ứng PCR theo đoạn môi được thiết kế bởi Schinitzler *et al.* (1998) [7]. Đoạn môi được thiết kế bởi Lew *et al.*, 2003. Sau đó chọn các mẫu sản phẩm PCR có băng sáng và rõ ở kết quả điện di, gửi mẫu đến Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phú Sa để giải trình tự gene. Kết quả Blast kiểm tra

định danh trình tự nucleotide được giải mã trên ngân hàng gene NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [10].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tình hình nhiễm cầu trùng trên gà theo tuần tuổi tại tỉnh Bến Tre

Qua bảng 1 cho thấy gà nhiễm cầu trùng với tỷ lệ 44,79%, không tìm thấy cầu trùng trong phân gà ở tuần tuổi thứ 1 và thứ 2. Gà bắt đầu nhiễm ở tuần tuổi thứ 3 (20,83%), càng về sau gà càng lớn, lượng phân thải ra nhiều là điều kiện thuận lợi cho cầu trùng phát triển và gây nhiễm ở 4 tuần tuổi 42,50%, 5 tuần tuổi là 83,33% và cao nhất ở tuần thứ 6 là 100%. Kết quả thống kê cho thấy tỷ lệ nhiễm cầu trùng có sự khác biệt giữa các tuần tuổi gà rất có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$). Cường độ nhiễm cầu trùng gà ở mức 1(+) là phổ biến (36,28%), 2(+) chiếm 26,36%, 3(+) là 12,40% và 4(+) là 24,96%. Cụ thể, gà bắt đầu nhiễm cầu trùng từ tuần tuổi thứ 3 có tỷ lệ nhiễm tương đối thấp (20,83%) với cường độ nhiễm 1+ (60%), 2+ (40%). Tỷ lệ tăng dần qua các tuần tuổi, tăng cao nhất ở tuần 6 là 100% và nhiễm với cường độ 4+ (84,17%). Vào tuần tuổi này gà đã có những biểu hiện như: ủ rũ, bỏ ăn, xù lông, phân có máu hay sấp và kèm với bệnh tích của bệnh cầu trùng như: niêm mạc manh tràng xuất huyết, chứa máu, chủ trại đã sử dụng thuốc trị cầu trùng. Kết quả tỷ lệ nhiễm cầu trùng giảm dần ở tuần tuổi thứ 8 trở đi.

Bảng 1. Tỷ lệ và cường độ nhiễm cầu trùng gà nòi lai theo tuần tuổi tại tỉnh Bến Tre

Tuần tuổi	Nhiễm chung			Cường độ nhiễm (%)			
	SM KT	SMN	TLN (%)	1+ TLN (%)	2+ TLN (%)	3+ TLN (%)	4+ TLN (%)
1	120	-	-	-	-	-	-
2	120	-	-	-	-	-	-
3	120	25	20,83	60,00	40,00	-	-
4	120	51	42,50	52,94	39,22	5,88	1,96
5	120	100	83,33	14,00	25,00	37,00	24,00
6	120	120	100	-	5,83	10,00	84,17
7	120	111	92,50	36,04	25,23	12,61	26,13
8	120	67	55,83	61,19	38,81	-	-
9	120	77	64,17	44,16	36,36	11,69	7,79
10	120	53	44,17	54,72	35,85	9,43	-
11	120	31	25,83	77,42	22,58	-	-
12	120	10	8,33	100,00	-	-	-
			<i>P < 0,01</i>				<i>P < 0,01</i>
Tổng	1440	645	44,79	36,28 ^a	26,36 ^b	12,40 ^c	24,96 ^b

Ghi chú: a, b, c: Các chữ mũ cùng một hàng khác nhau thì khác nhau

Chú thích: SMKT: Số mẫu kiểm tra; SMN: Số mẫu nhiễm; TLN: Tỷ lệ nhiễm.

3.2. Kết quả định danh các loài cầu trùng gà tại tỉnh Bến Tre bằng phương pháp thường quy

bào tử, kết quả thể hiện qua bảng 2.

3.2.1. Thành phần loài cầu trùng gà tại tỉnh Bến Tre

Qua kết quả bảng 2 có thể kết luận gà nòi lai nuôi ở các cơ sở khảo sát trên địa bàn tỉnh Bến Tre nhiễm 4 loài cầu trùng là *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria tenella*.

Qua phân loại đặc điểm hình thái, đo kích thước, nuôi cấy các loài cầu trùng và theo dõi thời gian sinh

Bảng 2. Thành phần các loài cầu trùng ký sinh ở gà nòi lai tại tỉnh Bến Tre

Kí hiệu	Hình dạng		Kích thước (µm)		Thời gian sinh bào tử (giờ)		Kết quả
	LT	TT	LT	TT	LT	TT	
Esp 1	Hình trứng, vỏ nhẵn, không màu, không micropile	Hình trứng hay elip, vỏ nhẵn, không màu, không micropile	Dài: 17,7-20,2 Rộng: 13,7-16,3	Dài: 16,5-19,6 Rộng: 12-17	24	16-28	<i>Eimeria acervulina</i>
Esp 2	Hình trứng hay bầu dục, vỏ sần sùi, màu vàng, có micropile	Hình trứng, vỏ sần sùi, màu vàng không micropile	Dài: 21,5-42,5 Rộng: 16,5-29,5	Dài: 22,5-34,5 Rộng: 17-24,5	30-48	24-42	<i>Eimeria maxima</i>
Esp 3	Hình cầu, vỏ nhẵn không màu, không micropile	Hình cầu, vỏ nhẵn không màu không micropile	Dài: 11,7-18,7 Rộng: 11,0-18,0	Dài: 13,8-17,8 Rộng: 13,2-17,2	18-48	14-36	<i>Eimeria mitis</i>
Esp 4	Hình trứng, vỏ nhẵn, không màu, không micropile	Hình trứng, vỏ nhẵn, không màu không micropile	Dài: 9-25 Rộng: 14-31	Dài: 21,5-25,2 Rộng: 18-22,6	18-48	18-26	<i>Eimeria tenella</i>

Chú thích: LT: Lý thuyết; TT: Thực tế.

3.2.2. Tỷ lệ nhiễm các loài cầu trùng ký sinh trên gà nòi lai theo tuần tuổi tại tỉnh Bến Tre

Bảng 3. Tỷ lệ nhiễm các loài cầu trùng ký sinh ở gà nòi lai theo tuần tuổi tại tỉnh Bến Tre

Tuần tuổi	<i>E. acervulina</i>		<i>E. maxima</i>		<i>E. mitis</i>		<i>E. tenella</i>	
	SMN	TLN (%)	SMN	TLN (%)	SMN	TLN (%)	SMN	TLN (%)
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	9	36,00	-	-	22	88,00
4	16	31,37	29	56,86	-	-	46	90,20
5	36	36,00	63	63,00	1	1,00	99	99,00
6	68	56,67	106	88,33	25	20,83	120	100
7	11	9,91	59	53,15	23	20,72	108	97,30
8	9	13,43	31	46,27	5	7,46	57	85,07

9	20	25,97	39	50,65	4	5,19	69	89,61
10	3	5,66	26	49,06	8	15,09	47	88,68
11	2	6,45	9	29,03	2	6,45	22	70,97
12	-	-	2	20,00	-	-	10	100
								<i>P</i> <0,01
Tổng	165	25,58 ^a	373	57,83 ^b	68	10,54 ^c	600	93,02 ^d

Ghi chú: a, b, c, d: Các chữ mũ trên cùng một hàng khác nhau thì khác nhau.

Chú thích: SMN: Số mẫu nhiễm; TLN: Tỷ lệ nhiễm.

Bảng 3 cho thấy, bắt đầu từ tuần thứ 3 gà nòi lai đã xuất hiện 2 loài cầu trùng là *E. tenella*, *E. maxima*, tỷ lệ nhiễm loài *E. tenella* cao hơn so với loài *E. maxima* (88,00%). Tính chung, gà các lứa tuổi nhiễm 4 loài cầu trùng, trong đó, loài *E. tenella* với tỷ lệ cao nhất (93,02%), tiếp theo là *E. maxima* (57,83%), loài *E. acervulina* (25,58%) và thấp nhất là loài *E. mitis* (10,54%). Điều này phù hợp với nghiên cứu của Yueyue Huang *et al.* (2017) [9] tại Trung Quốc cho rằng *E. tenella* là loài cầu trùng phổ biến rộng rãi nhất (80,67%), tiếp đến loài *E. necatrix*, *E. mitis*, *E. maxima*, *E. brunetti* và *E. acervulina* với tỷ lệ lần lượt là 68%, 55,33%, 54,67%, 44,67% và 2,67%. Qua phân tích thống kê cho thấy sự khác nhau về tỷ lệ nhiễm các loài cầu trùng trên gà giữa các tuần tuổi rất có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$).

3.3. Kết quả định danh loài cầu trùng trên đàn gà nòi lai thả vườn bằng phương pháp sinh học phân tử

3.3.1. Kiểm tra độ tinh sạch của DNA

Bảng 4. Kết quả đo OD mẫu sau khi ly trích DNA

Kết quả đo OD	Mẫu				
	BT1	BT2	BT3	BT4	BT5
OD ₂₆₀	1,09	1,35	2,16	1,77	1,2
OD ₂₈₀	0,62	0,71	1,35	0,93	0,71
Độ tinh sạch DNA (OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀)	1,76	1,9	1,6	1,9	1,69

Ghi chú: BT1 và BT2, BT3 và BT4, BT5 lần lượt là mẫu DNA của gà tuần tuổi thứ 5, thứ 6 và thứ 7

Mẫu sau khi ly trích được kiểm tra độ tinh sạch của DNA bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260 nm và 280 nm. Kết quả ở bảng 4 cho thấy mẫu DNA của BT2 và BT4 có độ tinh sạch cao nằm trong khoảng 1,8 đến 2. Còn mẫu BT1, BT3 và BT5 có độ tinh sạch thấp hơn 1,8 chứng tỏ mẫu còn lẫn tạp chất. Điều này do nhiều nguyên nhân như: trong quá trình chuyển dung dịch đã tách lớp qua

tùng ống eppendorf không cẩn thận hút nhầm các chất bẩn hoặc quy trình ly trích DNA chưa được tối ưu.

3.3.2. Kết quả sản phẩm PCR với các môi đặc hiệu cho từng loài cầu trùng

Sản phẩm PCR với các môi đặc hiệu cho *E. tenella*: Gene đặc hiệu cho *E. tenella* được khuếch đại từ DNA tổng số bằng phản ứng PCR với cặp môi đặc hiệu, ở nhiệt độ gần môi là 59°C trong 1 phút. Cho kết quả điện di trên gel agarose 2% như hình 1.

Đoạn môi: ETF^b – 5' ATT TTA GTC CAT CGC ACC CCT 3'

(278bp) ETR^b – 5' CGA GGG CTC TGC ATA GGA CA 3'

Phân tích hình ảnh trên gel agarose 2% được chụp dưới tia UV cho thấy, cặp môi sử dụng trong nghiên cứu đặc hiệu cao, thể hiện một băng sáng, rõ và không bị đứt gãy, trên gel với kích thước khoảng 278 bp đối với loài *E. tenella*. Esin *et al.* (2013) [3] khi nghiên cứu về *Eimeria* trên giống gà Thổ Nhĩ Kỳ cũng tìm được kích thước đoạn gene cho loài *E. tenella* là 278 bp bằng phương pháp PCR.

Sản phẩm PCR với các môi đặc hiệu cho *E. acervulina*: Gene đặc hiệu cho loài cầu trùng *E. acervulina* được khuếch đại từ DNA tổng số bằng phản ứng PCR với cặp môi đặc ở nhiệt độ bất môi là 62°C trong 1 phút 10 giây.

Đoạn môi: EAF^b – 5' GGC TTG GAT GAT GTT TGCTG 3'

(321bp) EAR^b – 5' CGA ACG CAA TAA CAC ACG CT 3'

Phân tích hình ảnh trên gel agarose 2% cho thấy, cặp môi sử dụng trong nghiên cứu có tính đặc hiệu cao, thể hiện một băng sáng, rõ và không bị đứt gãy, không có băng phụ, trên gel có kích thước khoảng 321 bp so với thang chuẩn (Hình 2). Kết quả trong nghiên cứu trong thí nghiệm trên phù hợp với nghiên

cứu của Hamidinejat *et al.* (2010) [4], tìm thấy loài *E. acervulina* trong mẫu phân của gà thịt ở Khuzestan, Iran với kích thước đoạn gene thể hiện trên gel agarose 1,5% là 321 bp.

Sản phẩm PCR với các môi đặc hiệu cho *E. mitis*:
Gene đặc hiệu cho loài cầu trùng *E. mitis* được khuếch đại từ DNA tổng số bằng phản ứng PCR với cặp môi đặc hiệu ở nhiệt độ 60°C trong 1 phút

Đoạn môi: EMi5FA – 5' CGG AGC TGG GGT TTT CTT TC 3'

(193bp) EMi5RA – 5' CCT GCA TAT CCA CA/GTT/CGA AC/AT AC 3'

Phân tích hình ảnh trên gel agarose 2% cho thấy, ở giếng BT1 và BT2 không có băng sáng xuất hiện, trên gel có kích thước khoảng 193 bp so với thang chuẩn (Hình 3).

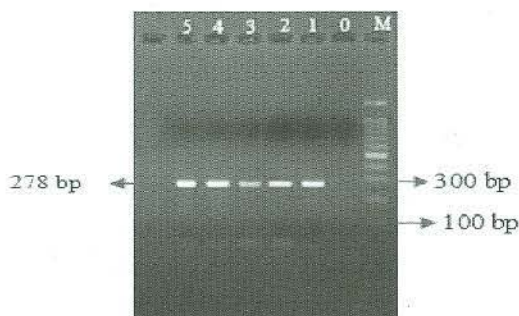
Sản phẩm PCR với môi đặc hiệu của *E. maxima*:
Gene đặc hiệu cho loài cầu trùng *E. maxima* được

khuếch đại từ DNA tổng số bằng phản ứng PCR với cặp môi đặc hiệu, ở nhiệt độ bắt mỗi là 60°C trong 1 phút.

Đoạn môi: EMFA2 – 5' GCG GTT TCA TCA TCC ATC ATC G 3'

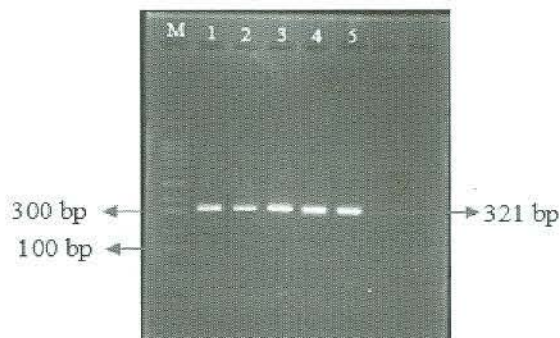
EMRA2 – 5' CGT TGT GAG AAG/A ACT GA/GA AGG G 3'

Phân tích hình ảnh trên gel agarose 2% cho thấy, cặp môi sử dụng trong nghiên cứu có tính đặc hiệu cao, thể hiện một băng sáng, rõ và không bị đứt gãy, trên gel có kích thước khoảng 145 bp so với thang chuẩn. Kết quả nghiên cứu trong thí nghiệm trên phù hợp với nghiên cứu của Kumar *et al.* (2013) [5]. Tác giả cũng tìm thấy loài *E. mitis* và *E. maxima* trong mẫu phân của gà thịt ở Uttarakhand thuộc Bắc Ấn Độ với kích thước đoạn gene thể hiện trên gel agarose 1,5% là 193 bp và 145 bp (Hình 4).



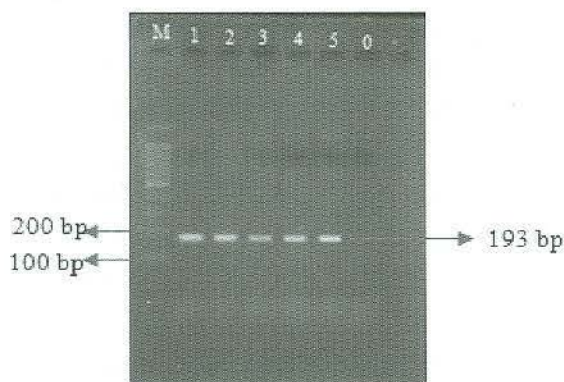
Hình 1. Kết quả điện di của *E. tenella*

M: Thang chuẩn DNA 100bp; giếng 0, 1, 2, 3, 4, 5 ứng với mẫu đối chứng âm, BT1, BT2, BT3, BT4, BT5



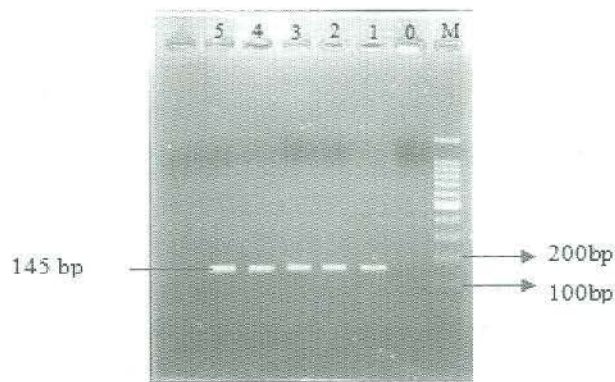
Hình 2. Kết quả điện di *E. acervulina*

M: Thang chuẩn DNA 100bp; giếng 1, 2, 3, 4, 5 ứng với mẫu BT1, BT2, BT3, BT4, BT5



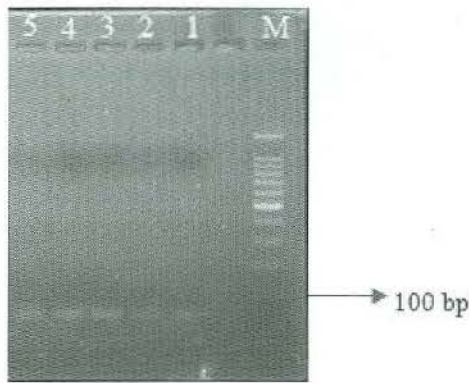
Hình 3. Kết quả điện di của *E. mitis*

M: Thang chuẩn DNA 100bp; giếng 0, 1, 2, 3, 4, 5 ứng với mẫu đối chứng âm, BT1, BT2, BT3, BT4, BT5



Hình 4. Kết quả điện di của *E. maxima*

M: Thang chuẩn DNA 100bp; giếng 0, 1, 2, 3, 4, 5 ứng với mẫu đối chứng âm, BT1, BT2, BT3, BT4, BT5



Hình 5. Kết quả điện di của *E. necatrix*

M: Thang chuẩn DNA 100bp; giếng 1, 2, 3, 4, 5 ứng với mẫu BT1, BT2, BT3, BT4, BT5

Sản phẩm PCR với mỗi đặc hiệu của *E. necatrix*: Gene đặc hiệu cho loài cầu trùng *E. necatrix* được khuếch đại từ DNA tổng số bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu, ở nhiệt độ bắt mồi là 57°C trong 45 giây.

Đoạn mồi: ENF – 5' TAC ATC CCA ATC TTT GAA TCG 3'

(383bp) ENR – 5' GGC ATA CTA GCT TCG AGC AAC 3'

Phân tích hình ảnh trên gel agarose 2% cho thấy không có băng sáng xuất hiện, có nhiều băng phụ. Chúng tỏ rằng không có *E. necatrix* trong mẫu ly trích DNA hoặc do chưa tối ưu hóa quy trình PCR cho loài này (Hình 5).

So sánh phương pháp định danh các loài cầu trùng bằng phương pháp thường quy và phương

pháp sinh học phân tử ta thấy cả hai phương pháp cho kết quả trùng khớp với nhau. Cụ thể, với phương pháp định danh thường quy đã xác định gà ở tuần tuổi thứ 5, thứ 6 và thứ 7 bị nhiễm 4 loài cầu trùng là *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima* và *E. mitis*. Bằng kỹ thuật sinh học phân tử, khuếch đại vùng gene ITS-1 với 5 cặp mồi đặc hiệu cho từng loài cầu trùng cũng ở tuần tuổi thứ 5, thứ 6 và thứ 7, kiểm tra sản phẩm qua điện di gel 2% agarose đã phát hiện được 4 loài là: *E. acervulina* (321 bp), *E. tenella* (278 bp), *E. mitis* (193 bp) và *E. maxima* (145 bp) với các băng sáng, rõ, không đứt và phù hợp với số bp của từng loài. Bên cạnh đó, vẫn chưa phát hiện được sự hiện diện của *E. necatrix* (383 bp) bằng phương pháp thường quy và phương pháp sinh học phân tử.

3.3.3. Kết quả giải trình tự gene vùng ITS - 1 của các loài noãn nang cầu trùng gà

Chọn các mẫu có băng sáng ở kết quả điện di, sau đó gửi mẫu để giải trình tự gene. Kết quả Blast kiểm tra định danh trình tự nucleotide được giải mã trên ngân hàng gene NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [10].

Kết quả giải trình tự gene của *E. acervulina*: Kết quả so sánh trình tự của *E. acervulina* với trình tự trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gene của NCBI cho thấy trình tự trên cơ sở dữ liệu tương đồng với đoạn gene ITS - 1 của *E. acervulina* với tỷ lệ tương đồng cao nhất là 97,78% (Hình 6).

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Emeria acervulina</i> isolate Cuxtaon 211 internal transcribed spacer 1 complete sequence	398	398	100%	7e-107	97.78%	KJ420580.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Emeria acervulina</i> isolate Cuxtaon 120UG internal transcribed spacer 1 complete sequence	398	398	100%	7e-107	97.78%	JX853827.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Emeria acervulina</i> isolate C internal transcribed spacer 1 complete sequence	398	398	100%	7e-107	97.78%	AF445058.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Emeria acervulina</i> clone FA-1133-20 18S ribosomal RNA gene partial sequence internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal	398	398	100%	7e-107	97.78%	AY779452.1

Hình 6. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của *E. acervulina* với trình tự trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gene của NCBI

Giải trình tự gene đã thu được chuỗi có 291 nucleotides có trình tự như sau: GKAAGTWTGACTTATCATCTACCAATCTTTGAA TCTGTTTTGTTTTCCACCACGACGCATTTTTGT GAAGAAAARAAGAGGAAAAAACCTGACTKTGCA WGCATCATTGCCACCTTTTGAAGGGATGGGATG ATGATGCATGCATGGGARGGGAGGGCGGCG CATGCACCGCTTGGGGCTTTTTGGGGCTTTGGG

GCTGTGGTGGTGGGGCTTGCATGCTACATGTGA CCCTGGCACKGCTGTCTA

Kết quả giải trình tự gene của *E. tenella*: Kết quả so sánh trình tự của *E. tenella* với trình tự trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gene của NCBI cho thấy trình tự trên cơ sở dữ liệu tương đồng với đoạn gene ITS-1 của *E. tenella* với tỷ lệ tương đồng cao nhất là 96,61% (Hình 7).

Description	GenBank		Graphics	Distance tree of results		
	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Eimeria tenella isolate Ena3CUPD internal transcribed spacer 1, partial sequence	102	102	80%	1e-18	96.61%	MG989812.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eimeria tenella strain DY internal transcribed spacer 1, partial sequence	102	102	80%	1e-18	96.61%	KY117152.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eimeria tenella strain XYZ internal transcribed spacer 1, partial sequence	102	102	80%	1e-18	96.61%	KY117151.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eimeria tenella strain SS2 internal transcribed spacer 1, partial sequence	102	102	80%	1e-18	96.61%	KY117149.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eimeria tenella strain HQ5 internal transcribed spacer 1, partial sequence	102	102	80%	1e-18	96.61%	KY117148.1
<input checked="" type="checkbox"/> Eimeria tenella strain HQ4 internal transcribed spacer 1, partial sequence	102	102	80%	1e-18	96.61%	KY117146.1

Hình 7. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của *E. tenella* với trình tự trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gene của NCBI

Giải trình tự gene đã thu được chuỗi có 106 nucleotide có trình tự như sau: TWATTYCYCTGCACGGTTTTCTACTTTTTTAAAA TGGATGGAATTTTTTGCTGCTGCAAGGRTATRTA GCAGYMRTWIKTACSTGGGSSAWCSGGGGGK GGGKGG

Như vậy, các loài cầu trùng được thu thập từ mẫu phân có cường độ nhiễm 3(+) và 4(+) từ tuần tuổi thứ 5 đến tuần tuổi thứ 7 qua phương pháp giải trình tự gene vùng ITS-1 đã xác định được 2 loài cầu trùng gây bệnh cho gà là: *E. acervulina*, *E. tenella* có độ tương đồng cao tương ứng 97,78% và 96,61% so với dữ liệu của ngân hàng gene trên NCBI. Đối với 2 loài còn lại là *E. maxima* và *E. mitis* vẫn đang tiến hành giải trình tự gene nên chưa thể đưa kết quả vào nghiên cứu này.

4. KẾT LUẬN

Đàn gà nòi lai thả vườn tại tỉnh Bến Tre nhiễm cầu trùng với tỷ lệ khá cao, chiếm 44,79%. Gà bắt đầu nhiễm cầu trùng ở tuần thứ 3 (25%) và tỷ lệ nhiễm tăng dần theo lứa tuổi, cụ thể đến tuần thứ 6 tỷ lệ nhiễm tăng đến 100%. Cường độ nhiễm 1(+) là phổ biến nhất với 36,28%, 2(+) chiếm 26,36%, 3(+) chiếm 12,40% và 4(+) là 24,96%.

Bằng phương pháp định danh thường quy, gà nòi lai thả vườn tại tỉnh Bến Tre nhiễm 4 loài cầu trùng là: *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. maxima*. Trong đó *E. tenella* phổ biến nhất (93,02%), sau đó là *E. maxima* (57,83%), *E. acervulina* (25,58%) và thấp nhất là *E. mitis* (10,64%).

Bằng phương pháp định danh loài cầu trùng bằng phương pháp sinh học phân tử, tiến hành khuếch đại vùng gene ITS-1 với 5 đoạn mồi và kiểm tra sản phẩm bằng điện di với gel agarose 2%, phát hiện thành công 4 loài là: *E. acervulina* (321 bp), *E. tenella* (278 bp), *E. maxima* (145 bp), *E. mitis* (193 bp). Bước đầu giải trình tự gene phát hiện được 2 loài là *E. tenella* và *E. acervulina* có độ tương đồng cao

tương ứng 96,61% và 97,78% so với dữ liệu cơ sở của Ngân hàng gene trên NCBI.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Dự án nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ Chính phủ Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Calnek, B. W., John B. H., Beard W. C., Larry McDougld, Saif, Y. M., (1997). Diseases of poultry, Iowa state university, USA, pp 865 - 878.
2. Eckert, J., R. Braun, M. W. Shirley and P. Coudert (1995). Biotechnology guidelines on techniques in coccidiosis research. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 1995 ISBN 92-827-4970-3 © ECSC-EC-EAEC, Brussels U Luxembourg, 1995 Printed.
3. Esin, G., Robert B. B., Sirri, K., Zati, V., Zafer, K. (2013). Molecular identification of *Eimeria* species of broiler chickens in Turkey. Ankara Univ Vet Fak Derg, 60, pp: 245-250.
4. Hamidinejat, H., Seifiabad, M. R., Mayahi, M., Borujeni, M. P. (2010). Characterization of *Eimeria* species in commercial broilers by PCR based on ITS1 regions of rDNA. *Iran J Parasitol*. 2010;5:48-54.
5. Kumar, S., Garg, R., Moftah, A., Clark, E. L., Macdonald, S. E., Chaudhry, A. S., Sparagano, O., Banerjee, P. S., Kundu, K, Tomley, F. M., Blake, D. P. (2013). An optimised protocol for molecular identification of *Eimeria* from chickens. *Vet Parasitol* 199(1-2):24-31.
6. Lew, A. E., Anderson, G. R., Minchin, C. M., Jeston, P. J., Jorgenesen, W. K. (2003). Inter- and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens. *Vet Parasitol* 112(PII s0303-4017(02)00393-X1-2):33-50.

7. Schnizler, B. E., Thebo, P. L., Mattson, J. G., Tomley, F. M., Shirley, M. W. (1998). Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria* species of the chicken. *Avian Pathol* 27(5) :490 - 49+.
8. Van Meirhaeghe H & De Gussem M (2014). Coccidiosis a major threat to the chicken gut. <http://www.poultryworld.net/Home/General/2014/9/Coccidiosis-a-major-threat-to-the-chicken-gut>
9. Yueyue Huang, Xiangchun Ruan, Lin Li, Minghua Zeng (2017). Prevalence of *Eimeria* species in domestic chickens in Anhui province, China, *Journal parasitology impact factor* 29, pp: 1209-1229.
10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

STUDY ON EIMERIA IN GA NOI LAI IN FREE-RANGE CHICKEN FARMS IN BEN TRE PROVINCE BY PARASITOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS

Nguyen Ho Bao Tran, Nguyen Huu Hung

Summary

This study aims to investigate the prevalence of coccidiosis and detect different *Eimeria* species in Ga noi lai- domestic chicken breed raised in free-range farms in Ben Tre province by parasitological and molecular methods. A total of 1440 fecal samples were collected from 1 to 12 week-old chickens. The findings showed that the infection rate of coccidiosis in chicken was quite high at 44.7%. The earliest infection was recorded in 3-week old chicken with a low infection rate of 25%. This infection rate in chicken peaked 100% in the 6th week and slightly dropped to 92.50% in the following week. The lowest infection rate was found in 12th week-old chicken. The highest intensity of infection (4+) and (3+) was corresponding to the high infection stages in the 6 (84.17%) and 7 week-old chickens (12.61%). Besides, four different species of *Eimeria*, namely *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. mitis*, and *E. maxima* were detected by parasitological methods. Of all four species, *E. tenella* was the most popular one in survey chickens with 93.02%, followed by *E. maxima* (57.83%), *E. acervulina* (25.58%) and *E. mitis* (10.64%). The mixed infection rate of three *Eimeria* species was 33.18%, while this rate of 4 species was only 15.33%. Fecal samples having the high intensity (+4) of *Eimeria* infection were extracted DNA and performed PCR with specific primers. The results from PCR and sequencing confirmed the presence of two *Eimeria* species: *E. tenella* and *E. acervulina* with high nucleotide and identities compared to references of 96.61% and 97.78% in Genbank, respectively.

Keywords: *Ga noi lai*, sequencing, *Eimeria* spp, Ben Tre.

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Thị Kim Lan

Ngày nhận bài: 7/8/2020

Ngày thông qua phản biện: 8/9/2020

Ngày duyệt đăng: 15/9/2020