

KẾT QUẢ KIỂM TRA CÁC ĐẶC TÍNH SINH HÓA VÀ XÂY DỰNG MỘT SỐ CHỈ TIÊU VỀ GIỐNG VI KHUẨN *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* ĐỂ SẢN XUẤT KHÁNG NGUYÊN

*Đào Thị Hảo¹, Cù Hữu Phú¹, Nguyễn Xuân Huyền¹,
Nguyễn Thị Bích Thủy¹, Lê Thị Minh Hằng¹, Nguyễn Thị Nga², Nguyễn Bá Hiên³*

TÓM TẮT

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy chủng vi khuẩn MGGC8 phân lập được đã đạt các tiêu chí về giống dùng để chế kháng nguyên MG như sau:

- Có tính thích nghi cao và ổn định trên phôi gà 7 ngày tuổi. Kết quả gây nhiễm cho thấy MGGC8 có khả năng gây chết phôi gà với bệnh tích đặc trưng, thời gian mà số lượng phôi chết tập trung sau khi gây nhiễm là từ 48-96 giờ, tương tự như chủng chuẩn MGS6 gây chết phôi gà.

- Phát triển ổn định trên các loại môi trường nuôi cấy và đều có phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh chuẩn serotype A (Týp huyết thanh A).

- Kết quả kiểm định bằng các phản ứng sinh học:

+ Điều lên men các loại đường glucoza và TTC (100%), không có chủng nào có sự chuyển hoá Arginin và PHO.

+ Điều cho kết quả dương tính khi sử dụng kỹ thuật PCR để xét nghiệm các chủng vi khuẩn. Kết quả xét nghiệm cho thấy sản phẩm trên gel Agarose của MG là 530 bp.

Từ khóa: Đặc tính sinh hóa, Kháng nguyên MG, Bệnh tích đặc trưng, Phản ứng ngưng kết

Result of biochemical characteristic test and developing some seed indexes of MG bacteria for antigenic production

*Dao Thi Hao, Cu Huu Phu, Nguyen Xuan Huyen,
Nguyen Thich Bich Thuy, Le Thi Minh Hang, Nguyen Thi Nga, Nguyen Ba Hien*

SUMMARY

Result of this study indicated that the isolated MGGC8 bacteria strain was met some seed indexes using for antigenic production as follows:

- High adaptation and stability in 7day old chicken embryos. Infection result showed that MGGC8 was able to kill chicken embryos with the typical lesions, the amount of concentrated dead embryos after 48-96 hours of infection was similar to that of the MGS6 standard strain.

- Stable development on different culture media and having agglutination reaction with standard antiserum, serotype A.

- Tested result by biological reactions:

+ All of the strains fermented glucoza and TTC (100%), none of them metabolized Arginine and PHO.

+ All of the strains have given the positive result when using PCR technique. The MG product obtaining on Agarose gel was 530 bp.

Keywords: Biochemical characteristic, MG antigen, Typical lesion, Agglutination reaction.

¹ Viện Thú y

² Công ty liên doanh thuốc thú y ViaVet

³ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Mycoplasma gallisepticum* (MG) là một trong những nguyên nhân quan trọng nhất gây nên bệnh viêm đường hô hấp mạn tính CRD ở gà và gây bệnh viêm xoang truyền nhiễm của gà tây, những tổn thất của bệnh gây ra có ảnh hưởng rất lớn với gà thịt, gà giống và gà đẻ thương phẩm.

Nhận thức được tầm quan trọng của việc phòng chống bệnh CRD, đã có nhiều nghiên cứu về bệnh CRD và vi khuẩn MG gây bệnh được tiến hành. Đây là một bệnh cần phải kiểm tra định kỳ, và được đặt lên hàng đầu là việc chẩn đoán bằng phản ứng ngưng kết nhanh. Từ năm 2007, Bộ môn Vi trùng, Viện Thú y đã phân lập và có giống vi khuẩn MGGC8; Bộ môn đã tiến hành chế tạo kháng nguyên (KN) MG dùng trong chẩn đoán bệnh CRD trên diện hẹp. Những nghiên cứu bước đầu về các chỉ tiêu vô trùng, an toàn và hiệu lực của kháng nguyên này đối với đàn gà nuôi ở Việt Nam đã cho kết quả tốt.

Với mục đích là chế tạo hoàn thiện và thành công kháng nguyên chẩn đoán từ chủng vi khuẩn MG phân lập được, nhằm góp phần phòng chống bệnh CRD ở Việt Nam đạt hiệu quả cao, chúng tôi tiến hành kiểm định lại giống vi khuẩn *M. gallisepticum* với ký hiệu MGGC8 đã được chọn, xây dựng và tiêu chuẩn hóa một số chỉ tiêu về giống để sản xuất kháng nguyên qua đề tài “Kiểm tra các đặc tính sinh hoá và xây dựng một số chỉ tiêu về giống vi khuẩn MG sản xuất kháng nguyên.”

II. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Kiểm định một số chỉ tiêu về giống vi khuẩn MG dùng để sản xuất kháng nguyên

1. Khả năng thích ứng và ổn định của chủng vi khuẩn MG trên phôi gà

2. Kiểm tra tính ổn định của giống vi khuẩn MG dùng chế KN

3. Kiểm định vi khuẩn MG bằng các phản ứng sinh hoá.

III. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

- Chủng vi khuẩn MG chuẩn, MG phân lập có sẵn tại Bộ môn Vi trùng.

+ Nguồn gốc của giống MGGC8: Phân lập từ cơ sở chăn nuôi (Trạm nghiên cứu và thử nghiệm thức ăn gia súc- Viện chăn nuôi) Hà Nội.

+ Giống MGS6 chuẩn: của Nhật Bản.

- KHT MG chuẩn đơn giá và đa giá do Viện Thú y Nhật Bản cung cấp.

- KHT MG tự chế của Bộ môn Vi trùng Viện Thú y.

- Hồng cầu gà được lấy từ gà trống khỏe mạnh có phản ứng HI âm tính với KN MG, nước muối sinh lý 0,85%.

- Các loại môi trường, hoá chất dùng trong nghiên cứu

+ Môi trường thích hợp cho sự phát triển của MG là môi trường Frey: *Mycoplasma Broth* (MB), *Mycoplasma Agar* (MA) được chuẩn bị theo qui trình của Tổ chức dịch tễ thế giới.

+ Môi trường dùng cho các phản ứng sinh hóa: 0,5 % Glucose trong nước thịt PPLO (MB)+ 0,002 % phenol red, pH= 7,8; 0,2 % Arginine trong MB+ 0,002% phenol red, pH= 6,8. 0,02% Tetrazolium chloride (TTC) trong MB; 0,01% Phenolphthalein diphosphate, muối natri (PHO) trong MB (Chuẩn bị trước khi dùng); 0,002% Phenol red trong MB, pH= 7,5.

+ Các loại hoá chất sử dụng trong phản ứng PCR do hãng Espec oligo service Corporation- Nhật Bản cung cấp với trình tự các cặp mỗi với MG theo Kiss và Cs (1997), được sử dụng như sau: (F: Forward; R: Reverse)

MGF: 5'AAC AAC AGA GGC GAA
GGC GAG3'

MGR: 5'ACG GAT TTG CAA CTG
TTT GTA TTG G3'

Sản phẩm PCR của MG sử dụng trong nghiên cứu này là 530 bp.

- Các máy móc và dụng cụ cần thiết khác.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp xác định hình thái, tính chất nuôi cấy, đặc tính sinh vật hoá học của vi khuẩn MG.

Theo tiêu chuẩn của Tổ chức Thú y thế giới OIE (2004) và Viện Thú y Nhật Bản.

- Phương pháp tăng cường giống vi khuẩn sản xuất KN trên trứng có phôi: gây nhiễm vào túi lòng đỏ phôi gà 6 - 7 ngày tuổi với huyền dịch MG đã được chuẩn độ liều 1×10^8 CFU/0,05ml- 1×10^8 CFU/0,1ml

- Phương pháp phát hiện kháng thể theo thường quy

+ Phản ứng ngưng kết nhanh trên phiến kính

+ Phản ứng ngưng kết và ngăn trở ngưng kết hồng cầu gà

- Phương pháp xác định kháng nguyên

+ Phản ứng immunoperoxidaza gián tiếp (IP) (Imada Y., 1982)

- Phương pháp xác định MG bằng phản ứng nhân gen (PCR)

Trình tự các cặp mồi với MG theo Kiss và cs (1997), được sử dụng như sau: (F: Forward; R: Reverse)

MGF: 5'AAC AAC AGA GGC GAA GGC GAG3'

MGR: 5'ACG GAT TTG CAA CTG TTT GTA TTG G3'

Sản phẩm PCR của MG là 530 bp.

IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tăng cường giống vi khuẩn MG sản xuất kháng nguyên trên trứng có phôi

Theo OIE (2000), vi khuẩn MG thích nghi trên phôi gà khi nuôi cấy trên phôi 6 - 7 ngày tuổi, thời gian gây chết phôi tập trung trong vòng từ 48-96 giờ sau khi tiêm. Chúng vi khuẩn MGGC8 sau khi

kiểm tra đạt các chỉ tiêu thuần khiết, khả năng sinh trưởng, hình thái vi khuẩn, hình thái khuẩn lạc, các đặc tính sinh hóa, chúng tôi đã tiến hành gây nhiễm trên phôi gà 7 ngày tuổi, chủng MGGC8 được gây nhiễm cùng chủng MGS6 chuẩn để so sánh

Kết quả thu được cho thấy: Chủng vi khuẩn MG có tính thích ứng cao và ổn định trên phôi gà 7 ngày tuổi. Tính thích ứng đó biểu hiện ở sự nhân lên của vi khuẩn trong phôi, gây chết phôi ở từng thời điểm tương đối ổn định và số phôi chết tập trung ở khoảng thời gian từ 48 - 96 giờ (bảng 1).

Lần thí nghiệm thứ nhất, tiêm vi khuẩn MG cho 8 phôi (mỗi chủng vi khuẩn cho 4 phôi). Tỷ lệ phôi chết trong từng thời điểm là: Thời điểm 48 giờ có 1 phôi, 72 giờ có 2 phôi, 96 giờ có 5 phôi; thời điểm 48 - 96 giờ có 8/8 phôi chết, chiếm tỷ lệ 100%. Lô đối chứng: Phôi gà đối chứng phát triển bình thường, không có phôi nào chết.

Lần thí nghiệm thứ hai, tiêm vi khuẩn MG cho 8 phôi (mỗi chủng vi khuẩn cho 4 phôi). Kết quả cho thấy không có phôi nào chết trong vòng 48 giờ, cả hai chủng vi khuẩn đều gây chết trong vòng 72 giờ, chiếm tỷ lệ 100%. Lô đối chứng: Phôi gà đối chứng phát triển bình thường, không có phôi nào chết.

Thông qua số phôi chết, bệnh tích của phôi khi mổ khám cho ta thấy sự có mặt của vi khuẩn MG và đặc tính thích ứng cao của vi khuẩn trên phôi gà. Chủng vi khuẩn MGGC8 dùng để chế kháng nguyên có những đặc tính cơ bản giống chủng MGS6 chuẩn.

Trong các lần thí nghiệm, số lượng và tỷ lệ phôi chết ở từng thời điểm có sự khác nhau vì điều này có liên quan đến số lượng vi khuẩn nhân lên trong phôi và sức đề kháng của phôi. Thời gian phôi chết cao nhất là ở 72 giờ, tập trung ở đợt cấy truyền 2 sau khi đã được tăng cường ở lần 1.

Như vậy, kết quả cấy truyền cho thấy chủng vi khuẩn MGGC8 và MGS6 qua quá trình bảo quản vẫn giữ được tính ổn định về độc lực và khả năng thích nghi cao trên phôi gà.

Bảng 1. Kết quả tăng cường giống vi khuẩn MG trên trứng có phôi

Đợt TN	Chỉ tiêu	Lô 1 (MG S6)	Lô 2 (MG GC8)	Lô 3 (Đối chứng)	Ghi chú
Đợt 1	Số lượng phôi	4	4	2	
	Liều gây bệnh (vk/ml)	1*10 ⁸	1*10 ⁸	Nước thịt MB	
	Đường tiêm	Túi noãn hoàng	Túi noãn hoàng	Túi noãn hoàng	
	Số phôi chết (24 giờ)	0	0	0	
	Số phôi chết (48 giờ)	1	0	0	
	Số phôi chết (72 giờ)	1	1	0	
	Số phôi chết (96 giờ)	2	3	0	
	Tổng số phôi chết	4	4	0	Sau 5 ngày
Đợt 2	Chỉ tiêu	Lô 1 (MG S6)	Lô 2 (MG GC8)	Lô 3 (Đối chứng)	
	Số lượng phôi	4	4	2	
	Liều gây bệnh (vk/ml)	1*10 ⁸	1*10 ⁸	Nước thịt MB	
	Đường tiêm	Túi noãn hoàng	Túi noãn hoàng	Túi noãn hoàng	
	Số phôi chết (24 giờ)	0	0	0	
	Số phôi chết (48 giờ)	0	0	0	
	Số phôi chết (72 giờ)	4	4	0	
	Số phôi chết (96 giờ)	0	0	0	
	Tổng số phôi chết	4	4	0	Sau 5 ngày

Ghi chú: Phôi gà đối chứng phát triển bình thường

Sau khi cấy truyền trên phôi gà, chúng tôi
mổ phôi và quan sát biến đổi bệnh lý trên phôi.
Kết quả theo dõi biến đổi bệnh lý của phôi sau

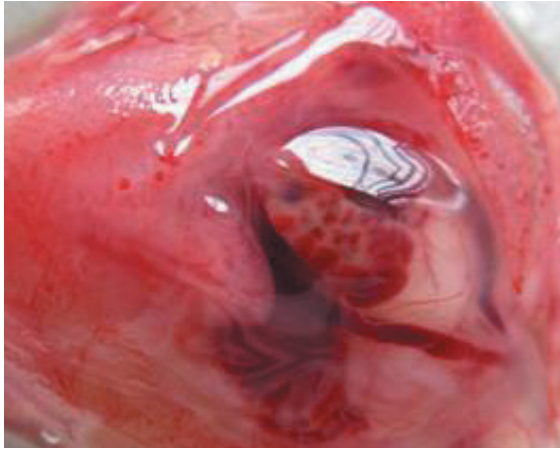
khi gây nhiễm vi khuẩn MG được trình bày ở
bảng 2.

Bảng 2. Kết quả mổ khám phôi gà sau khi gây nhiễm

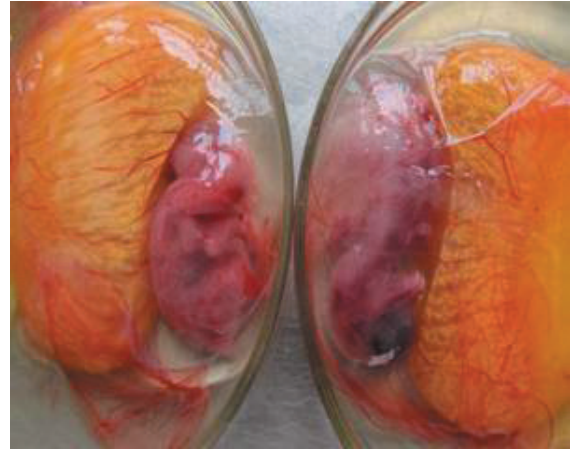
Đợt TN	Tình trạng phôi	Số lượng	Bệnh tích	Ghi chú
Đợt 1	Phôi chết	8	Phôi thai bé, tụ máu, xuất huyết ngoài da; gan sưng, viêm; lách sưng; viêm ngoại tâm mạc (8/8)	15/6/14
	Phôi sống	2	Phôi thai to hơn các phôi ở lô chết, không có bệnh tích gì bất thường (2/2)	
Đợt 2	Phôi chết	8	Phôi thai tụ máu, xuất huyết ngoài da; gan sưng, viêm; lách sưng; viêm ngoại tâm mạc (8/8)	30/8/14
	Phôi sống	2	Phôi thai to hơn các phôi ở lô chết, không có bệnh tích gì bất thường (2/2)	

Bệnh tích xuất huyết trên da là phổ biến nhất (100%), phôi thai bé, tụ máu, gan sưng, viêm; lách sưng, viêm ngoại tâm mạc. Phù phôi thấy

rõ ở các phôi chết trong khoảng từ 72-96 giờ. Đặc biệt phôi còi cọc thấy ở các phôi chết trong khoảng thời gian từ 72-96 giờ (hình 1, hình 2).



Hình 1. Bệnh tích gan sưng, viêm phôi gà gây nhiễm MG



Hình 2. Bệnh tích phôi gây nhiễm MG
Phôi trái: phôi bị gây nhiễm MG
Phôi phải: đối chứng không gây nhiễm MG

Trong quá trình mổ khám để quan sát bệnh tích của phôi, lòng đỏ của phôi được cấy chuyên vào nước thịt và lên thạch để phân lập lại vi

khuẩn MG 5 ngày sau gây nhiễm. Kết quả thu được được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phân lập và xác định MG từ phôi gà bằng PCR

Đợt TN	Tình trạng phôi	Số lượng	Nuôi cấy		PCR (530 bp)	Ghi chú
			MB	MA		
Đợt 1	Phôi chết	8	+	+	+	
	Phôi sống	2	-	-	-	
Đợt 2	Phôi chết	8	+	+	+	
	Phôi sống	2	-	-	-	

Qua hai đợt thí nghiệm, bằng các phương pháp chẩn đoán khác nhau, kết quả cho thấy cả hai phương pháp nuôi cấy trên môi trường nước thịt (MB), trên môi trường thạch (MA) và PCR đều cho kết quả dương tính là 8/8. Như vậy, giống vi khuẩn MG tăng cường trên trứng đã giữ được độc lực và ổn định trên phôi gà.

3.2 Kết quả kiểm tra tính ổn định của giống vi khuẩn MG dùng chế KN

Để xác định tính ổn định của giống vi khuẩn MG, chúng tôi đã sử dụng sáu chủng vi khuẩn MGS6, MGGC8 giữ trong môi trường thạch lòng, đông khô và chủng đã tăng cường qua phôi trứng, tiến hành nuôi cấy và theo dõi sự phát triển trên các loại môi trường MB, MA; tiến hành đo pH và làm đồng bộ các phản ứng để đánh giá, kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả kiểm tra tính ổn định của giống MG dùng chế KN

TT	Giống VK	MB	Thời gian chuyển màu môi trường	pH	Nhuộm Giemsa	MA	IP	HI $\geq 1/8$	KHTC
1	MGS6 ₁	+	4 ngày	5,4	+	+	+	+	+
2	MGS6 ₂	+	4 ngày	5,3	+	+	+	+	+
3	MGS6 ₃	+	4 ngày	5,4	+	+	+	+	+
4	MGGC8 ₁	+	4 ngày	5,5	+	+	+	+	+
5	MGGC8 ₂	+	4 ngày	5,4	+	+	+	+	+
6	MGGC8 ₃	+	4 ngày	5,4	+	+	+	+	+

Ghi chú: MGS6₁-giống MGS6 đông khô; MGS6₂-giống MGS6 giữ ở thạch lỏng; MGS6₃-giống MGS6 đã tăng cường qua phơi trùng; MGGC8₁-giống MGGC8 đông khô; MGGC8₂-giống MGGC8 giữ ở thạch lỏng; MGGC8₃-giống MGGC8 đã tăng cường qua phơi trùng; KHTC: kháng huyết thanh MG chuẩn

Kết quả bảng 4 cho thấy cả 6 chủng vi khuẩn đều mọc tốt trên môi trường nước thịt (MB). Trên môi trường MB được kiểm tra sự thay đổi màu hàng ngày, chất chỉ thị được chuyển từ màu đỏ sang màu da cam và cuối cùng là màu vàng từ 3,5 ngày. Khi phát triển, khuẩn lạc không làm vẩn đục hoặc chỉ hơi làm vẩn môi trường, pH môi trường MB của 6 chủng MG từ 7,8 dao động xuống trong khoảng 5,3 đến 5,5.

Bằng phương pháp nhuộm Giemsa, 6 chủng vi khuẩn MG đều có dạng tiểu cầu khuẩn, nằm giống nhau hoặc ở dạng từng đám nhỏ, bắt màu đỏ, kích thước 0,25 - 0,5 mm.

Trên môi trường thạch MA, quan sát trên kính hiển vi, các khuẩn lạc của 6 chủng vi khuẩn MG đều có dạng đặc trưng hình trứng ốp lết, kích thước 0,1 - 1 mm.

Kết quả của chúng tôi phù hợp với Yoder và Hofstad, (1964): Trong môi trường nước thịt nuôi cấy *Mycoplasma* bảo quản ở -30°C, mầm bệnh MG sống được 2 ÷ 4 năm, trong môi trường nước thịt rồi đông khô ở 4°C, MG sống được ít nhất 7 năm. Khi bảo quản ở 37°C, MG chỉ ổn định trong dung dịch PBS khoảng 24 giờ.

Trong phản ứng IP gián tiếp bằng mảnh giấy lọc vuông nhỏ, phản ứng sau khi nhuộm có màu xanh, cả 4 chủng MG đều có kết quả dương tính.

Với kỹ thuật nhuộm IP, thời gian tốt nhất khuẩn

lạc mọc trên môi trường MA là ở 5 - 7 ngày và phải đặt giấy lọc cẩn thận.

Việc xác định serotype của MG tốt nhất là phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HI), cả 6 chủng vi khuẩn đem nghiên cứu đều có hiệu giá ngưng kết HI $\geq 1/8$. Chủng MGS6 dùng trong thí nghiệm là chủng chuẩn của Malaixia (2000) đã được cấy chuyển trong phòng thí nghiệm và cũng chính là chủng được chọn làm kháng nguyên cho phản ứng HI. Việc tiêm truyền trong phòng thí nghiệm có thể dẫn tới làm giảm độc lực nên dẫn đến hiệu giá HI giảm, nhưng vẫn đạt ở hiệu giá HI $\geq 1/8$ là yêu cầu của phản ứng.

Các chủng vi khuẩn đều cho kết quả dương tính khi làm phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh chuẩn serotype A.

Như vậy, các chủng vi khuẩn MG mà chúng tôi nuôi cấy đều có các đặc điểm hình thái, nuôi cấy, đảm bảo các chỉ tiêu về giống như miêu tả của tác giả Rasin và cs, (1998).

3.3 Kết quả kiểm định vi khuẩn MG bằng các phản ứng sinh hoá

Vi khuẩn MG thuộc nhóm vi khuẩn lên men đường glucoza, vì vậy việc chuyển hoá glucoza là một trong những phản ứng bắt buộc trong việc xác định đặc tính của MG. Sự lên men glucoza có thể được đánh giá bằng sự thay đổi pH làm chuyển màu môi trường. Bên cạnh đó, chúng

tôi dùng phản ứng PCR để kiểm định lại gen của 6 chủng vi khuẩn gồm các chủng MGS6, MGGC8 giữ trong môi trường thạch lỏng, đông

khô và chủng đã tăng cường qua phôi trứng. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

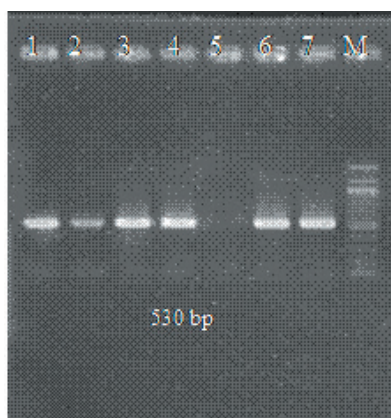
Bảng 5. Kết quả kiểm tra đặc tính sinh hóa và kiểm định bằng PCR

Chỉ tiêu	Chủng MGS6 ₁	Chủng MGS6 ₂	Chủng MGS6 ₃	Chủng MGGC8 ₁	Chủng MGGC8 ₂	Chủng MGGC8 ₃
Glucose	+	+	+	+	+	+
TTC	+	+	+	+	+	+
PHO	-	-	-	-	-	-
ARG	-	-	-	-	-	-
PCR (530 bp)	+	+	+	+	+	+

Ghi chú: MGS6₁-Chủng MGS6 đông khô; MGS6₂-chủng MGS6 giữ ở thạch lỏng; MGS6₃-chủng MGS6 đã tăng cường qua phôi trứng; MGGC8₁-chủng MGGC8 đông khô; MGGC8₂-chủng MGGC8 giữ ở thạch lỏng; MGGC8₃-chủng MGGC8 đã tăng cường qua phôi trứng

Kết quả trình bày ở bảng 5 cho thấy, 6/6 chủng MG đều lên men các loại đường glucoza và TTC (100%), không có chủng nào có sự chuyển hoá Arginin và PHO.

Kết quả bảng 5 còn cho thấy, cả 6 chủng MG đều cho kết quả dương tính tương ứng khi sử dụng kỹ thuật PCR. Kết quả sản phẩm trên gel Agarose của MG là 530 bp (ảnh).



Ảnh: Sản phẩm PCR kiểm định các chủng vi khuẩn MG

Ghi chú: - Giếng 1 (chủng MGS6₁), giếng 2 (chủng MGS6₂), giếng 3 (chủng MGS6₃), giếng 4 (chủng MGGC8₁), giếng 5 (đối chứng âm), giếng 6 (chủng MGGC8₂), giếng 7 (chủng MGGC8₃), giếng M (ADN chuẩn 100 bp)

Từ những kết quả đạt được, chúng tôi có một số nhận xét sau:

- Giống vi khuẩn MGGC8 khi gây bệnh trên trứng có khả năng gây chết phôi trong vòng 48-96 giờ.

- Giống vi khuẩn MGGC8 được phân lập từ năm 2007 đạt được các yêu cầu về tính lặp lại và tính ổn định khi kiểm tra các đặc tính sinh hóa.

Việc xác định các đặc tính sinh hóa và ADN của vi khuẩn cho thấy: Chủng vi khuẩn MG mà chúng tôi phân lập có các đặc tính hoá học và ADN đặc hiệu của mầm bệnh đặc trưng với các chủng MG chuẩn; cả 2 chủng nuôi cấy trên các môi trường dùng trong nghiên cứu đều ổn định, thuần khiết, đảm bảo các chỉ tiêu sinh hoá và đạt các chỉ tiêu về giống vi khuẩn MG. Kết quả nghiên cứu mà chúng tôi đạt được tương tự như kết quả thẩm định giống MGGC8 tại Trung tâm kiểm nghiệm thuốc thú y Trung ương I năm 2014.

IV. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn MG/C8 đạt các tiêu chí về giống dùng để chế kháng nguyên MG:

- Có tính thích nghi cao và ổn định trên phôi gà 7 ngày tuổi.

- Phát triển ổn định trên các loại môi trường nuôi cấy, đều có phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh chuẩn serotype A (Týp huyết thanh A)

- Kết quả kiểm định bằng các phản ứng sinh học:

- + Điều lên men các loại đường glucoza và TTC (100%), không có chủng nào có sự chuyển hoá Arginin và PHO.

- + Điều cho kết quả dương tính tương ứng khi sử dụng kỹ thuật PCR. Kết quả sản phẩm trên gel Agarose của MG là 530 bp.

Chủng vi khuẩn MG mà chúng tôi nuôi cấy có các đặc điểm hình thái, tính chất nuôi cấy, các đặc tính hoá học và AND đặc hiệu của mầm bệnh đặc trưng của các chủng MG chuẩn, có tính ổn định cao, thuần khiết và đạt các chỉ tiêu về giống vi khuẩn để sản xuất kháng nguyên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bencina D. & Bradbury J. M. (1989), Indirect immunoperoxidase assay for the detection of in chicken Mycoplasma infection, *Avian Pathology*, 20, 113 - 124.
2. Bradbury J. M., Yavari C. A., Dare Cm. (2001), Mycoplasma and respiratory disease in pheasants and partridges, *Avian Pathology*, 30[4], 391 - 396
3. Clyde W. A. Jr. (1983), Growth inhibition tests. In: *Methods in Mycoplasmaology*, Vol.1, Razin S. & Tully J.G., eds. Academic Press, New York, USA, and London, UK, 405 - 410.
4. Dybvig K., Voelker L.L. (1996), Molecular biology of mycoplasmas, *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 25 - 57.
5. Edward D. G. ff., and Moore W. B. (1974), The determination of metabolism of glucose. "Document of a Working Group of the FAO-WHO Programme on Comparative Mycoplasmaology," WHO Doc. No. VPH/M1c/74.2. World Health Organ. Geneva. In "Methods in Mycoplasmaology", Vol 1, 337-343.
6. Frey M. L., Hanson R. P. and Anderson D. P. (1968), A medium for the isolation of avian mycoplasmas, *Am. J. Vet. Res.*, 29, 2163 - 2171.
7. Freundt E. A., (1983), Culture media for classic mycoplasmas, In: *The Mycoplasmas*, Vol. 1, Razin S. & Tully J.G., eds, Academic Press, New York, USA and London, UK, 127 - 135.
8. Imada Y. (1987), Mycoplasma identification by filter paper, I P, *Natl.Inst. Anim. Heat Q*, 25, 16 - 21.
9. Kempf I., Gesbert F. and Guittet M. (1997), Experimental infection of chickens with a typical Mycoplasma gallisepticum strain: comparison of diagnostic methods, *Vet. Sci.*, 63, 211 - 213.
10. Kiss I., Matiz K., Kaszanyitzky E., Chavez Y., Johanson K.E. (1997), Detection and identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay, *Vet Microbiol.*, 58(1), 23 - 30.
11. OIE manual standards for diagnoses and vaccine (2000), Chapter 3.6.3, *Avian mycoplasmosis*, 1 - 10.
12. Razin S., Yorgev D., Naot Y., (1998), Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas, *Microbiology and molecular biology reviews*, 62[4] 1094 - 1156.

Nhận ngày 19-6-2015

Phản biện ngày 20-10-2015