

PHÁT TRIỂN DÒNG VI KHUẨN BIỂU HIỆN ĐỘC TỐ ĐƯỜNG RUỘT TÁI TỔ HỢP CỦA VI KHUẨN ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* GÂY TIÊU CHẢY Ở LỢN CON

Võ Thành Thìn, Lê Đình Hải, Đặng Văn Tuấn, Vũ Khắc Hùng
Phân viện thú y miền Trung

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là tạo được chủng vi khuẩn có khả năng biểu hiện độc tố đường ruột tái tổ hợp. Trong nghiên cứu này, chuỗi gen mã hóa đồng thời ba loại độc tố đường ruột của vi khuẩn *E. coli* được khuếch đại và gắn vào vector pET 24a(+) và pET32a(+) và biến nạp thành công vào tế bào biểu hiện *E. coli* BL21. Kết quả kiểm tra tạo dòng bằng phương pháp PCR và giải trình tự cho thấy, các chủng vi khuẩn BL21 mang chuỗi gen tái tổ hợp có trình tự nucleotide phù hợp so với trình tự nucleotide của gen mã hóa các loại độc tố STa, STb và LT trên ngân hàng gen. Các chủng vi khuẩn mang chuỗi gen tái tổ hợp có thể biểu hiện protein mong muốn trong môi trường LB broth với chất cảm ứng là IPTG.

Từ khóa: ETEC, biểu hiện, độc tố, tái tổ hợp

Development of enterotoxin gene expression bacteria of enterotoxigenic *Escherichia coli* caused diarrheal disease in piglets

Vo Thanh Thin, Le Dinh Hai, Dang Van Tuan, Vu Khac Hung

SUMMARY

The objective of this study was to create recombinant enterotoxin gene expression cells. The genetic fusion of enterotoxin gene was amplified and attached into 24a(+) and pET32a(+) vector and then transfected to BL21 successfully. PCR amplification and nucleotide sequence were used for determination of genetic fusion of enterotoxin gene in BL21 strain. The recombinant proteins were evaluated by SDS-PAGE and the immunoreactivity was characterized by Western blotting. The studied results showed that nucleotide sequences of genetic fusion of enterotoxin genes were consistent with nucleotide sequences of STa, STb and LT on GeneBank. The desired recombinant protein was expressed in LB broth with 1mM IPTG substance as inducer.

Keywords: ETEC, expression, toxin, recombinant.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhóm vi khuẩn enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) là một trong những nguyên nhân quan trọng gây tiêu chảy ở lợn con trước và sau cai sữa. Lợn con bị tiêu chảy thường gây còm, ốm yếu và có thể dẫn đến chết (Dubreuil và cs., 2016, Nagy và Fekete, 2005). Trong nhiều biện pháp phòng bệnh cho lợn, thì phòng bệnh bằng vaccin là biện pháp hiệu quả nhất (Melkebeek và cs., 2013, Zhang, 2014). Hiện nay, với sự phát triển mạnh của khoa học công nghệ thì việc phát triển vaccin tiểu phần tái tổ hợp là một hướng sản xuất đem lại hiệu quả phòng bệnh cao bởi những đặc tính của nó. Đây là vaccin

chỉ sử dụng những tiểu phần (là những yếu tố gây bệnh của vi sinh vật) được tái tổ hợp, chính vì vậy mà hiệu quả phòng bệnh cao và an toàn (Clark và Cassidy-Hanley, 2004).

Đối với nhóm vi khuẩn ETEC gây tiêu chảy ở lợn con, một số yếu tố gây bệnh của chúng đã được xác định, đó là các kháng nguyên bám dính và các loại độc tố. Các kháng nguyên bám dính như F4, F5, F18... sẽ giúp vi khuẩn bám vào niêm mạc ruột và tiết các độc tố đường ruột (STs, LT). Chính các độc tố đường ruột là nguyên nhân trực tiếp gây rối loạn trao đổi nước và chất điện giải trong đường ruột, kết quả là lợn con bị tiêu chảy

(Gyles và Fairbrother, 2010). Cho đến nay, một số loại vaccin tiểu phần sử dụng kháng nguyên là các yếu tố bám dính để sản xuất vaccin. Tuy nhiên, do sự đa dạng về kháng nguyên bám dính của nhóm vi khuẩn ETEC dẫn đến là hiệu quả phòng bệnh của các loại vaccin này vẫn không cao. Mặt khác, một số chủng vi khuẩn không mang kháng nguyên bám dính nhưng vẫn có khả năng gây bệnh tiêu chảy ở lợn con (Nagy và cs., 1992). Theo Lê Đình Hải và cs. (2017), các gen mã hóa độc tố đường ruột của các chủng vi khuẩn ETEC gây tiêu chảy ở lợn con tại Việt Nam có tính tương đồng cao. Chính vì vậy, sử dụng kháng nguyên là các loại độc tố để sản xuất vaccin là một biện pháp có thể mang lại hiệu quả phòng bệnh cao. Bởi vậy, mục đích của nghiên cứu này là tạo được chủng vi khuẩn biểu hiện chuỗi gen tái tổ hợp mã hóa đồng thời 3 loại độc tố đường ruột của vi khuẩn *E. coli* (STa, STb và LT).

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

Phát triển dòng vi khuẩn *E. coli* có mang vector biểu hiện protein độc tố đường ruột tái tổ hợp STa-LTB-STb.

2.2. Nguyên vật liệu

- Chủng vi khuẩn: chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 alpha có mang chuỗi gen tái tổ hợp STa-LTB-STb (Lê Đình Hải và cs., 2017). Chủng vi khuẩn biểu hiện protein *E. coli* BL21 [F⁻, ompT, hsd

SB (rB⁻, mB⁻), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cmr], (Promega – Mỹ).

- Các bộ kit và các loại hóa chất: kit tinh sạch sản phẩm PCR (Qiagen, Đức); kit tinh sạch plasmid (Qiagen, Đức); kit tinh sạch sản phẩm PCR từ gel (Qiagen, Đức). Ampicillin, Kanamycin Sulfate (Thermo Fisher Scientific – Mỹ). Enzym giới hạn XhoI và NdeI (Promega – Mỹ), các loại enzym khác T4 DNA Ligase, Pfu DNA Polymerase (Promega – Mỹ). Plasmid biểu hiện pET-32a(+), pET-24(+) của hãng Novagen.

- Các loại môi trường nuôi cấy vi khuẩn: Luria Bertani Broth (LB), Luria Bertani agar (LB agar).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khuếch đại chuỗi gen STa-LTB-STb (SLS)

Tiến hành khuếch đại đoạn gen mã hóa đồng thời 3 loại độc tố (gen SLS) từ chủng *E. coli* DH5 alpha mang vector gen tái tổ hợp bằng cặp mồi ss (bảng 1) với các vị trí cắt của enzym được đánh dấu (*in nghiêng đậm*). Phản ứng PCR được tiến hành với tổng thể tích là 50 µl gồm: Pfu DNA Polymerase 10X Buffer: 5µl, dNTP (200µM): 1µl, mồi xuôi (10µM): 1µl, mồi ngược (10µM): 1µl, Pfu DNA Polymerase (3u/µ): 1 µl, DNA: 3µl và nước đến 50 µl. Chu trình nhiệt là 95°C: 10 phút; (95°C: 1 phút; 60°C: 1 phút; 72°C: 3 phút) 30 chu kỳ; 72°C: 10 phút, giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên agarose 1,2% và sau đó được tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch sản phẩm PCR (Qiagen, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi dùng trong nghiên cứu

Mồi	Trình tự mồi (chiều 5' đến 3')	Nhiệt độ bắt cặp (°C)	Gen khuếch đại
ss - F1	GCCTACA CATATGA AACACATTCTACTG	55	SLS
ss - R1	ACG CTCGAGG CATCCTTTTGCTGCAACCATTA		
T7-F	TAATACGACTCACTATAGGG	55	pET vector
T7-R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG		

Ghi chú: chữ in đậm, nghiêng là vị trí cắt của emzym giới hạn

2.3.2. Chuẩn bị vector và đoạn gen SLS

- Vector pET32, pET24 và đoạn gen SLS đã tinh sạch, sẽ được cắt bằng 2 emzym giới hạn XhoI

và NdeI. Hỗn hợp phản ứng phân cắt được ủ ở 37°C trong 3 giờ. Sản phẩm sau khi phân cắt bằng enzym giới hạn được điện di trên thạch agarose 1,2 % có bổ sung Ethidium bromide. Sau đó tiến

hành tinh sạch các sản phẩm đã cắt bằng enzym giới hạn từ gel bằng bộ kit.

2.3.3. Nối đoạn gen SLS vào vector

Tiến hành nối đoạn gen SLS vào vector bằng enzym T4 ligase với các thành phần như sau:

Vector	3 µl
DNA	3 µl
Ligase buffer	1 µl
T4 DNA	0,33 µl
Nước	6,67 µl
Tổng thể tích	10 µl

- Hỗn hợp ligase trên được giữ ở 16°C trong 3 giờ.

2.3.4. Biến nạp plasmid pET có chứa đoạn gen SLS vào tế bào *E. coli* BL21

- Chuyển 2µl hỗn hợp ligase vào 100 µl tế bào khả biến *E. coli* BL21, ủ trong đá 10 phút, tiến hành sốc nhiệt ở 42°C trong 42 giây và ủ trong đá 2 phút. Sau đó thêm 900 µl môi trường SOC vào và ủ ở 37°C trong 1 giờ, lắc 225 vòng/phút. Chuyển hỗn hợp trên lên môi trường LB agar có bổ sung kháng sinh phù hợp đối với từng plasmid, nuôi cấy ở 37°C qua đêm.

2.3.5. Chọn dòng và kiểm tra kết quả tạo dòng

- Chọn những khuẩn lạc đặc trưng phát triển trên môi trường LB agar; kiểm tra kết quả tạo dòng bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi T7 - F và T7 - R, giải trình tự nucleotide.

2.3.6. Phương pháp kiểm tra khả năng biểu hiện protein độc tố tái tổ hợp ở *E. coli*

- Các dòng tế bào *E. coli* BL21 có mang plasmid tái tổ hợp pET24a/SLS và pET32a/SLS cùng với các chủng đối chứng được nuôi cấy trên LB lỏng. Sau khi giá trị OD600 đo bằng máy quang phổ của dịch nuôi cấy đạt từ 0,6 thì bổ sung IPTG sao cho nồng độ cuối cùng đạt 1mM. Tiếp tục nuôi cấy lắc 150 vòng/phút ở 37°C trong 5 giờ. Ly tâm 2 ml canh khuẩn, thu sinh khối và phân tích protein bằng điện di SDS-PAGE và Western blot

đã được áp dụng với kháng thể sơ cấp là 6x-His Tag polyclonal (mã số PA1-983B) và kháng thể thứ cấp là Anti-Rabbit IgG (mã số 65-6120).

Xác định trọng lượng phân tử của protein

Đo khoảng cách di chuyển của các băng protein từ gel phân tách tới các vạch protein và khoảng cách từ gel phân tách tới vạch màu bromophenol (vạch màu cuối cùng).

Tính giá trị Rf:

$$Rf = \frac{\text{Khoảng cách di chuyển của protein lectin}}{\text{Khoảng cách từ gel phân tách đến dung môi (vạch màu Bromophenol blue)}}$$

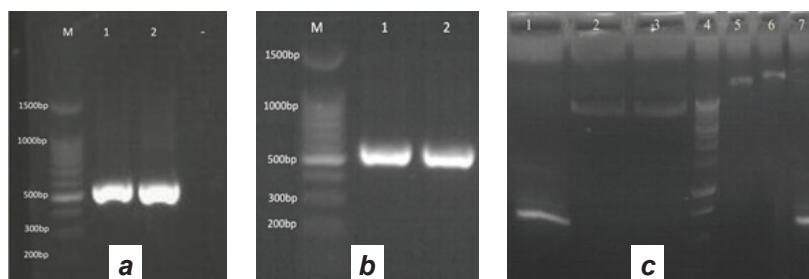
Trọng lượng phân tử của các vạch protein có thể xác định thông qua giá trị Rf trên, nhờ phương pháp ngoại suy theo đồ thị.

Dựa vào thang chuẩn trên gel điện di, tiến hành xác định giá trị Rf của từng vạch protein. Từ đó, xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính ($\log M_w = aRf + b$) giữa giá trị Rf và $\log M_w$ (lg trọng lượng phân tử) của các protein trong thang chuẩn bằng phần mềm Excel.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khuếch đại, tinh sạch đoạn gen SLS, plasmid và phân cắt bằng enzym giới hạn

Để phân tách đoạn gen SLS, đoạn gen khoảng 570bp được khuếch đại từ plasmid của chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 alpha có mang chuỗi gen tái tổ hợp SLS. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và kiểm tra bằng điện di. Kết quả kiểm tra cho thấy kích thước sản phẩm PCR sau khi tinh sạch là 570 bp. Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch cũng như là plasmid sẽ được cắt bằng 2 enzym giới hạn. Kết quả kiểm tra bằng điện di cho thấy: đối với các plasmid đã được cắt đồng thời bằng 2 enzym giới hạn có kích thước hoàn toàn khác với plasmid chưa cắt. Còn đối với đoạn gen SLS, do 2 enzym chỉ cắt đi khoảng 10 nucleotide nên không phân biệt được bằng điện di giữa 2 đoạn gen cắt bằng enzym và không cắt. Như vậy, cả 2 loại enzym đã cắt hoàn toàn plasmid cũng như đoạn gen SLS (hình 1).



Hình 1. Kết quả khuếch đại, tinh sạch đoạn gen SLS, plasmid và phân cắt bằng enzym giới hạn

(1a): kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại bằng cặp mồi ss-F1 và ss- R1

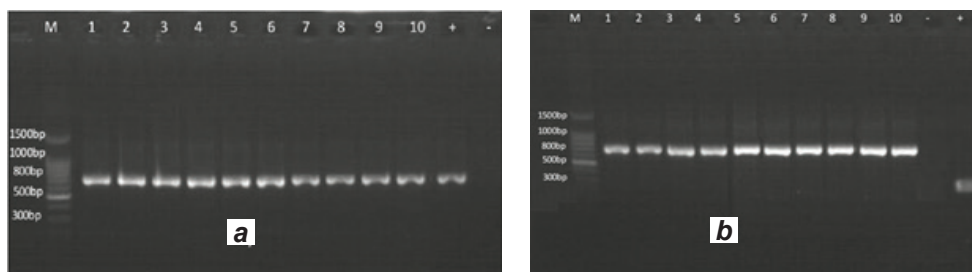
(1b): sản phẩm PCR sau khi tinh sạch

(1c): kết quả điện di các sản phẩm PCR và plasmid sau khi cắt bằng enzym giới hạn, giếng 1: sls cắt bằng enzym giới hạn, giếng 2-3: pET24 và pET23 đã được cắt bằng enzym giới hạn, giếng 4: Maker (1Kb), giếng 5- 6: plasmid pET24 và pET23 chưa cắt bằng enzym giới hạn, giếng 7: SLS chưa được cắt bằng enzym giới hạn.

3.2. Kết quả tạo dòng và kiểm tra tạo dòng vi khuẩn biểu hiện độc tố đường ruột

Đoạn gen SLS và plasmid sau khi được nối với nhau bằng enzym ligase và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21 và trải trên đĩa thạch LB có chứa kháng sinh phù hợp với từng loại vector để chọn các khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp pET-SLS. Mười khuẩn lạc khác nhau cho mỗi loại vector đã được chọn và tách chiết DNA để kiểm tra bằng phản ứng PCR. Kết quả kiểm tra cho thấy: sản phẩm PCR của tất cả các khuẩn lạc mọc trên môi trường LB có kháng sinh đều cho kích thước mong muốn khoảng 750bp (phù hợp với lý thuyết).

Trong nghiên cứu này, khi sử dụng 2 enzym NdeI và XhoI để cắt, chúng sẽ cắt đi một đoạn khoảng 539bp đối với pET32 và 80bp đối với pET24a(+). Chính vì vậy mà khi chèn đoạn gen SLS (có kích thước 550bp) vào plasmid, kích thước của các sản phẩm PCR khuếch đại với cặp mồi T7 không thay đổi đối với các chủng vi khuẩn BL21 mang vector pET32(a) có chứa đoạn gen và không chứa đoạn gen SLS (khoảng 750bp) (hình 2a). Tuy nhiên, có sự sai khác về kích thước sản phẩm PCR đối với chủng chỉ mang vector pET24 và chủng mang vector pET24 có chứa đoạn gen SLS (khoảng 750bp so với 130bp) (hình 2b).



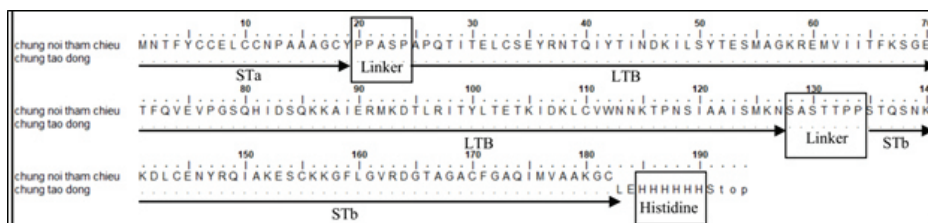
Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra kết quả tạo dòng bằng PCR với cặp mồi T7-F và T7-R

a: sản phẩm PCR khuếch đại từ vector pET32. 1-10 là các khuẩn lạc khác nhau được chọn trên môi trường LB. (-): đối chứng âm chủng vi khuẩn BL21 không mang plasmid, (+): đối chứng dương là plasmid pET32

b: sản phẩm PCR khuếch đại từ vector pET24. 1 -10 là các khuẩn lạc khác nhau được chọn trên môi trường LB có kháng sinh. (-): đối chứng âm là chủng vi khuẩn BL21 không mang plasmid, (+): đối chứng dương là plasmid pET24.

Sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi T7 của mười khuẩn lạc khác nhau đối với mỗi loại vector được giải trình tự nucleotide. Kết quả cho thấy: tất cả các khuẩn lạc mang pET32 và pET 24 đều cho trình tự

nucleotide hoàn toàn giống với chủng tham chiếu. Từ kết quả trình tự nucleotide, chúng tôi xác định được chuỗi acid amin giả định bằng phần mềm (<https://web.expasy.org/translate/>) (hình 3).

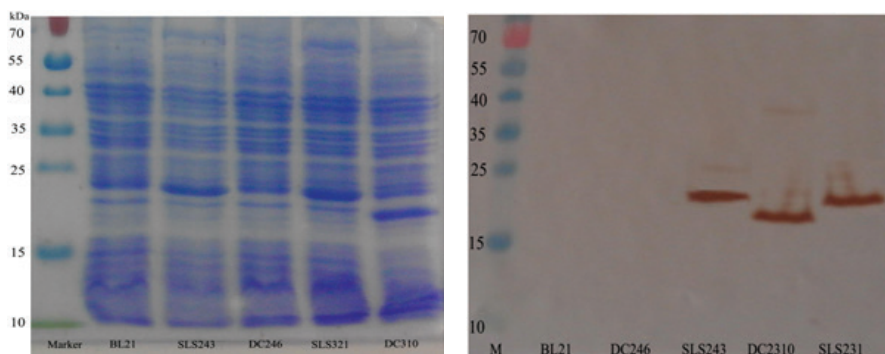


Hình 3. Trình tự acid amin giả định của chủng mang gen tái tổ hợp

Phân tích chuỗi acid amin cho thấy, giữa các độc tố có trình tự acid amin làm cầu nối (linker) là PPASP và SASTTPP. Chính các linker này giúp cho các độc tố không những vẫn giữ được đặc tính của chúng mà còn làm tăng vai trò của độc tố STa và STb. Bên cạnh đó, do gen SLS được chuyển vào hệ thống vector pET nên chuỗi protein tạo ra được nối 1 polyhistidine gồm 6 acid amin. Trình tự His-tag này sẽ giúp protein bám vào cột sắc ký, nên chuỗi protein sẽ được tinh sạch dễ dàng hơn (Bornhorst và Falke, 2000).

3.3. Kiểm tra khả năng biểu hiện protein của các chủng

Các dòng tế bào *E. coli* BL21 có mang plasmid tái tổ hợp pET24a/SLS (chủng SLS242) và pET32a/SLS (chủng SLS321) được sử dụng để kiểm tra khả năng biểu hiện protein mong muốn so với các chủng đối chứng là BL21, BL21 chỉ mang vector pET24 (chủng DC246) và BL21 chỉ mang vector pET32 (chủng DC310). Kết quả kiểm tra khả năng biểu hiện protein mong muốn của các chủng được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Kết quả kiểm tra khả năng biểu hiện protein của các chủng

Bên trái là SDS-page nhuộm bằng Coomassie và bên phải là phản ứng lai Western blot với kháng thể đặc hiệu anti-histag

Từ kết quả kiểm tra khả năng biểu hiện protein mong muốn bằng SDS-page và Western blot cho thấy: cả hai chủng SLS243 và SLS321 đều có khả năng sản sinh protein với kích thước tương tự kích thước đoạn protein mong muốn là 21kDa. Sở dĩ trong phản ứng lai Western blot, chủng DC310 không mang chuỗi gen

tái tổ hợp vẫn xuất hiện vạch màu nâu của cơ chất là do đối với vector pET32a không mang đoạn gen tái tổ hợp vẫn có thể sản sinh một chuỗi acid amin khoảng 20 kDa có gắn đuôi histag nên mới xuất hiện sau sự kết hợp với kháng thể kháng histidine. Như vậy kết quả của chúng tôi là phù hợp với lý thuyết. Từ những kết quả

trên cho thấy, chúng tôi đã tạo được chủng vi khuẩn biểu hiện protein tái tổ hợp độc tố đường ruột của vi khuẩn ETEC. Chủng vi khuẩn sẽ là tiền đề để chúng tôi nghiên cứu và sản xuất vaccin tiểu phần tái tổ hợp.

Cho đến nay, chủng vi khuẩn BL21 vẫn là chủng vi khuẩn tốt nhất sử dụng để biểu hiện protein tái tổ hợp. Trong đó chủng BL21(DE3)pLysS thường được dùng trong biểu hiện protein dung hợp với 6xHis bằng vector biểu hiện pET. Hệ thống này cho phép biểu hiện vượt mức protein, đồng thời hạn chế tối đa hiện tượng phiên mã rò rỉ khi không có chất cảm ứng. Chủng BL21(DE3)pLysS có chứa gen T7 mã hóa R7 RNA polymerase có nguồn gốc từ bacteriophage DE3 dạng tiềm tàng. Ngoài ra chủng này có thiết kế thêm plasmid pLysS gọi là *E. coli* BL21(DE3)pLysS giúp tế bào tổng hợp được một lượng nhỏ T7 lysozyme có vai trò bất hoạt T7 RNA polymerase. Vector pET có chứa promoter nên các gen nằm ở phía sau promoter sẽ được phiên mã nhờ hoạt tính của T7 RNA polymerase của tế bào chủ. Như vậy, chủng này có đặc điểm hạn chế sự tổng hợp protein từ hệ thống vector pET khi không có chất cảm ứng. Bên cạnh đó, chủng BL21(DE3)pLysS còn bị đột biến khuyết sản phẩm protease *OmpT* và *Lon* nên hạn chế tối đa sự thủy phân không mong muốn của protein tổng hợp (Sorensen và Mortensen, 2005). Trong nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi sẽ tiến hành nghiên cứu các điều kiện tối ưu để thu được lượng protein mong muốn cao nhất.

IV. KẾT LUẬN

- Đã tạo ra chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 mang gen tái tổ hợp mã hóa độc tố đường ruột của vi khuẩn *E. coli* gây bệnh tiêu chảy ở lợn con.

- Chủng vi khuẩn mang gen tái tổ hợp có khả năng biểu hiện protein mong muốn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Đình Hải, Đặng Văn Tuấn, Vũ Khắc Hùng, Võ Thành Thìn, 2017. Sự lưu hành và tương đồng gen mã hóa độc tố đường ruột (STa, STb và LT) của vi khuẩn enterotoxigenic *E. coli* phân lập từ lợn con bị tiêu chảy. Khoa học kỹ thuật thú y, XXIV(1), 38-52.
2. Lê Đình Hải, Đặng Văn Tuấn, Vũ Khắc Hùng, Võ Thành Thìn, 2017. Nghiên cứu tạo dòng vi khuẩn DH5 alpha mang chuỗi gen tái tổ hợp mã hóa độc tố đường ruột (STa, STb và LT) của vi khuẩn *E. coli*. Kỷ yếu Hội nghị khoa học chăn nuôi - thú y toàn quốc 2017, trang 354.
3. Bornhorst, J. A. and J. J. Falke, 2000. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods in enzymology*, 326, 245-254.
4. Clark, T. and D. Cassidy-Hanley, 2004: Recombinant subunit vaccines: potentials and constraints. *Developments in biologicals*, 121, 153-163.
5. Dubreuil, J. D., R. E. Isaacson and D. M. Schifferli, 2016: Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 7 (1).
6. Gyles, C. L. and Fairbrother, J. M., 2010. *Escherichia coli*, in Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Fourth Edition (eds C. L. Gyles, J. F. Prescott, J. G. Songer and C. O. Thoen), Wiley-Blackwell, Oxford, UK. doi: 10.1002/9780470958209.ch15
7. Melkebeek, V., B. M. Goddeeris and E. Cox, 2013: ETEC vaccination in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 152, 37-42.
8. Nagy, B., L. H. Arp, H. W. Moon and T. A. Casey, 1992: Colonization of the Small Intestine of Weaned Pigs by Enterotoxigenic *Escherichia coli* that Lack Known Colonization Factors. *Veterinary pathology*, 29, 239-246.
9. Nagy, B. and P. Z. Fekete, 2005: Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International journal of medical microbiology* : IJMM, 295, 443-454.
10. Sørensen, H. P. and K. K. Mortensen, 2005: Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115, 113-128.
11. Zhang, W., 2014: Progress and challenges in vaccine development against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)-associated porcine Post-Weaning Diarrhoea (PWD). *J Vet Med Res*, 1, 1006.

Ngày nhận 29-3-2018

Ngày phản biện 16-5-2018

Ngày đăng 1-7-2018