

KẾT QUẢ PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA CÁC CHỦNG *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* Ở LỢN DƯƠNG TÍNH VỚI VIRUT RỐI LOẠN HÔ HẤP VÀ SINH SẢN TẠI TỈNH BẮC GIANG

Lê Văn Dương¹, Nguyễn Quang Tuyên²
Cù Hữu Phú³, Hoàng Đăng Huyền¹

TÓM TẮT

Qua nghiên cứu 245 mẫu bệnh phẩm ở lợn dương tính với virus rối loạn hô hấp và sinh sản (PRRS) tại Bắc Giang cho thấy:

- Tỷ lệ phân lập được vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* tương đối cao (19,59%), trong đó cao nhất là bệnh phẩm ở lợn sau cai sữa từ 1,5 - 3 tháng tuổi (26,67%).
- Đã xác định có 35 chủng *A. pleuropneumoniae* phân lập được thuộc serotype 2 (72,92%); 10 chủng thuộc serotype 5a (20,83%) và 3 chủng thuộc serotype 5b (6,25%).
- Các chủng *A. pleuropneumoniae* phân lập được đều có đặc tính sinh vật học điển hình phù hợp với tài liệu trong và ngoài nước đã công bố.
- Các chủng *A. pleuropneumoniae* phân lập được đều có độc lực cao, trong đó có 9/12 chủng gây chết 100% chuột thí nghiệm sau 18-36 giờ và 3/12 chủng gây chết 50% chuột thí nghiệm sau 18-48 giờ.

Từ khóa: Lợn, *A. pleuropneumoniae*, PRRS, Phân lập, Xác định, Tỉnh Bắc Giang

RESULTS OF ISOLATION AND IDENTIFICATION OF SOME BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* IN THE PIGS INFECTED WITH PRRSV IN BAC GIANG PROVINCE

Le Van Duong, Nguyen Quang Tuyen
Cu Huu Phu, Hoang Dang Huyen

SUMMARY

Through the examination of co-infected bacteria in 245 pigs infected with PRRS virus in Bac Giang province, the results showed that:

- The infection rate of *Actinobacillus pleuropneumoniae* was rather high (19,59%), in which the highest prevalence was found in 1,5 to 3 months old piglets (26,67%).
- 35 isolated *A. pleuropneumoniae* species were belong to serotype 2 (72,92%); 10 species belong to serotype 5 A (20,83%) and 3 species belong to serotype 5 b (6,25%).
- The *A. pleuropneumoniae* isolated species have all typical biological characteristics
- All *A. pleuropneumoniae* isolates had high toxicity, among them 9/12 species killed 100% experimental mice after 18-36 hours and 3/12 species killed 50% mice after 18-36 hours..

Key words: Pig, *A. pleuropneumoniae*, PRRS, Isolation, Identification, Bac Giang province

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bắc Giang là tỉnh có nghề chăn nuôi lợn phát triển đem lại nguồn thu nhập cao cho nhiều hộ gia đình. Theo thống kê chăn nuôi của tỉnh Bắc Giang, năm 2011 tổng đàn lợn của tỉnh trên 1.260.000 con (trong đó khoảng 187.650 lợn nái và 1.072.350 lợn thịt). Trong tỉnh có trên 450 trại chăn nuôi lợn tập trung (quy mô 20 nái và 100 lợn thịt trở lên). Cũng như nhiều địa phương khác trong cả nước,

¹ - Chi cục Thú y tỉnh Bắc Giang

² - Viện khoa học sự sống- Đại học Thái Nguyên

³ - Viện Thú y quốc gia

chăn nuôi lợn tập trung theo quy mô lớn ở Bắc Giang đã và đang gặp rất nhiều khó khăn, đặc biệt là dịch bệnh ảnh hưởng lớn tới năng suất chăn nuôi. Một trong những bệnh quan trọng hiện nay của ngành chăn nuôi lợn là bệnh đường hô hấp, do nhiều nguyên nhân gây nên như vi khuẩn, virus, ký sinh trùng... Trong đó do các vi khuẩn là khá phổ biến, các vi khuẩn này có thể trực tiếp hoặc gián tiếp tạo điều kiện cho nguyên nhân thứ phát gây bệnh. Vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) là tác nhân gây viêm phổi - màng phổi (VPMP) ở lợn. Bệnh này có đặc tính lây lan mạnh, ảnh hưởng tới tăng khối lượng, tỷ lệ loại thải và chất lượng con giống. Ngoài ra, chi phí điều trị cũng rất cao, đặc biệt nghiêm trọng khi bệnh xảy ra đồng thời với hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản (PRRS) làm tổn thất nặng nề về kinh tế, gây hoang mang cho người chăn nuôi. Chính vì vậy, chúng tôi triển khai xác định một số đặc tính sinh học của các chủng *A. pleuropneumoniae* phân lập được từ bệnh phẩm lợn dương tính với virus PRRS tại Bắc Giang nhằm tìm ra các biện pháp phòng trị hiệu quả cao.

II. Nội dung , vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nội dung

- Phân lập vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* từ bệnh phẩm lợn dương tính với virus PRRS.
- Xác định một số đặc tính sinh vật hóa học của các chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được.
- Xác định serotype của các chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được.
- Xác định độc lực của các chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được.

2.2. Vật liệu

- * Mẫu bệnh phẩm là phổi, cuống họng, dịch nhày cuống họng của lợn bị ốm, chết có biểu hiện triệu chứng, bệnh tích của bệnh PRRS, viêm phổi - màng phổi tại tỉnh Bắc Giang.
- * Động vật thí nghiệm: chuột nhắt trắng khỏe mạnh (18-20g/con).
- * Các loại môi trường nuôi cấy, phân lập, kiểm tra đặc tính sinh học của vi khuẩn đường hô hấp; hoá chất, dụng cụ... phòng thí nghiệm Bộ môn vi trùng-Viện Thú y quốc gia.
- * Giống vi khuẩn: Các chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* tham chiếu của serotype từ 1- 12 và các huyết thanh chuẩn tương ứng do Viện thú y Nhật Bản cung cấp.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Các phương pháp phân lập, giám định, kiểm tra độc lực vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* được thực hiện theo Quy trình của Bộ môn vi trùng-Viện Thú y.
- Số liệu được xử lý theo phương pháp toán học thông dụng.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập *A. pleuropneumoniae* từ bệnh phẩm lợn dương tính với virus PRRS ở các lứa tuổi

Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân lập *A. pleuropneumoniae* từ mẫu bệnh phẩm lợn dương tính với virus PRRS ở các lứa tuổi

Đối tượng	Loại mẫu	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu Dương tính	Tỷ lệ (%)	T.chung (%)
Lợn con (SS- 1,5 tháng tuổi)	Cuống họng	32	4	12,50	10,34
	Phổi	26	2	7,69	
Lợn sau cai sữa (>1,5- 3 tháng tuổi)	Cuống họng	40	11	27,50	26,67
	Phổi	35	9	25,71	

Lợn vỗ béo (>3- 6 tháng tuổi)	Cuồng họng	38	7	18,42	17,57
	Phổi	36	6	16,67	
Lợn nái	Cuồng họng	20	5	25,00	23,68
	Phổi	18	4	22,22	
Tính chung		245	48		19,59

Kết quả ở bảng 1 cho thấy trong các mẫu bệnh phẩm lợn dương tính với virus PRRS theo bốn nhóm tuổi đều phân lập được *A. pleuropneumoniae*. Tính chung tỷ lệ phân lập được từ 245 mẫu là 19,59%, trong đó cao nhất ở lợn sau cai sữa >1,5-3 tháng tuổi (26,67%) và thấp nhất là ở lợn con (10,34%).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với kết quả của Đặng Xuân Bình và cs (2007) đã phân lập được *A. pleuropneumoniae* từ 37 bệnh phẩm phổi lợn có bệnh tích viêm dính màng phổi tại Hà Tây và Thái Nguyên với tỷ lệ mẫu dương tính là 31,25%.

Tỷ lệ phân lập được cho thấy lợn sau cai sữa dễ mắc bệnh hơn ở các giai đoạn nuôi vỗ béo, lợn con sơ sinh – 1,5 tháng tuổi và lợn nái. Điều này có thể do ở giai đoạn sau cai sữa, lợn chịu tác động bởi nhiều yếu tố stress như cai sữa, tách ghép đàn mới, môi trường sống, thức ăn thay đổi...dẫn đến làm giảm sức đề kháng, tạo điều kiện cho các vi khuẩn gây bệnh xâm nhập hoặc có sẵn ở trong cơ thể phát triển và gây bệnh. Do đó, công tác quản lý chăm sóc đàn lợn ở giai đoạn sau cai sữa là hết sức cần thiết.

Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả của Chier và cs (2002) khi nghiên cứu về tuổi cảm nhiễm và biến đổi huyết thanh học ở các lứa tuổi của lợn, đã cho thấy hàm lượng kháng thể kháng lại độc tố Apx cao nhất vào lúc lợn được 4 tuần tuổi, sau đó giảm dần đến 12 tuần tuổi, sau đó lại tăng lên nên sự nhiễm trùng thường xảy ra chủ yếu ở giai đoạn trước 3 tháng tuổi. Lợn ở các tuần tuổi đầu và lợn trên 3 tháng tuổi có hàm lượng kháng thể cao, giúp cơ thể chống lại vi khuẩn nên tỷ lệ nhiễm thấp hơn.

3.2. Kết quả xác định đặc tính sinh học của các chủng *A. pleuropneumoniae* phân lập được

Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định một số đặc tính sinh học của các chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được

TT	Một số đặc tính	Số lượng mẫu	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)	Theo Moller và cs (1996)
1	Bắt màu Gram (-)	48	48	100	Gram (-)
2	Dung huyết	48	48	100	+
3	CAMP	48	48	100	+
4	Urease	48	48	100	+
5	O.N.P.G	48	48	100	+
6	Yếu tố V	48	48	100	V
7	Oxidase	48	48	100	+
8	Catalase	48	48	100	+
9	Indol	48	0	0	-
10	MacConkey	48	0	0	-

Kết quả ở bảng 2 cho thấy 100% số chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* dương tính với phản ứng urease, Catalase, oxidase, CAMP, O.N.P.G. và 100% số chủng âm tính với phản ứng sinh Indol, không mọc trên thạch MacConkey. Số chủng *A. pleuropneumoniae* cần yếu tố V cho quá trình phát triển là 100%.

Kết quả giám định 48 chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được cho thấy chúng đều có những đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* như Moller và cs (1996)[13] đã mô tả và cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Cù Hữu Phú và cs (2005)[7]; Trịnh Quang Hiệp và cs (2004)[5].

48 chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* cũng được giám định với các phản ứng lên men đường trên môi trường lỏng và môi trường thạch. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Phản ứng lên men đường của các chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được

TT	Loại đường	Môi trường thạch (n = 48)		Môi trường lỏng (n = 48)	
		Lên men	Tỷ lệ (%)	Lên men	Tỷ lệ (%)
1	Glucose	+	100	+	100
2	Arabinose	-	0	-	0
3	Galactose	+	100	+	100
4	Lactose	-	0	-	0
5	Raffinose	-	0	-	0
6	Fructose	+	100	+	100
7	Maltose	+	100	+	100
8	Sorbitol	-	0	-	0

Kết quả ở bảng 3 cho thấy 100% số chủng có khả năng lên men loại đường glucose, galactose, fructose, maltose và 100% số chủng không lên men đường arabinose, lactose, raffinose, sorbitol. Như vậy, có thể thấy cả hai phương pháp kiểm tra lên men các loại đường khác nhau đều cho kết quả đồng nhất. Kết quả nghiên cứu về đặc tính sinh vật, hóa học của các chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được đều phù hợp với những mô tả đã của Moller và cs (1996)

3.3. Kết quả xác định serotype các chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được

Xác định typ huyết thanh học của 48 chủng *A. pleuropneumoniae* phân lập được bằng phản ứng kết tủa khuếch tán trên thạch với kháng huyết thanh chuẩn của 15 serotype khác nhau do Nhật Bản, Úc chế tạo, kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xác định serotype của các chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được bằng phản ứng AGID

Đối tượng	Số chủng vi khuẩn	Kết quả xác định serotype		
		Serotype 2	Serotype 5a	Serotype 5b
Lợn con (SS- 1,5 tháng tuổi)	6	5	1	0
Lợn sau cai sữa (>1,5- 3 tháng tuổi)	20	14	5	1
Lợn vỗ béo (>3- 6 tháng tuổi)	13	9	3	1
Lợn nái	9	7	1	1
Tổng hợp	48	35 (72,92%)	10 (20,83%)	3 (6,25%)

Từ bảng 4 cho thấy trong tổng số 48 chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được có 35 chủng thuộc serotype 2 (72,92%); 10 chủng thuộc serotype 5a (20,83%) và 3 chủng thuộc serotype 5b (6,25%). Như vậy, có thể thấy serotype 2 là phổ biến ở các đàn lợn nuôi tại các địa phương thuộc tỉnh Bắc Giang, sau đó là serotype 5. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với kết quả của một số tác giả trong nước như Cù Hữu Phú và cs (2005)[7]; Trịnh Quang Hiệp và cs (2004)[5]; Nguyễn Thị Thu Hằng (2010) cho thấy sự có mặt của serotype 2 chiếm ưu thế trong các serotype phân lập được từ lợn nuôi tại một số địa phương miền Bắc Việt Nam.

3.4. Kết quả xác định độc lực các chủng *A. pleuropneumoniae* phân lập được

Chọn 12 chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* có các yếu tố đặc trưng theo khu vực để xác định độc lực trên chuột nhắt trắng, từ đó làm cơ sở cho việc lựa chọn chủng chế tạo vaccine thử nghiệm. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả kiểm tra độc lực của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được

Ký hiệu chủng	Số chuột tiêm	Liều tiêm (ml) (~ $7,7 \times 10^8$ CFU/0,2ml)	Đường tiêm	Số chuột chết	Thời gian chết (giờ)	Phân lập lại VK
AHH-BG 1	2	0,2	Phúc xoang	2	36	+
AHH-BG 2	2	0,2		1	48	+
AVY-BG 3	2	0,2		2	24	+
AVY-BG 4	2	0,2		2	18	+
ATY-BG 5	2	0,2		2	24	+
ATY-BG 6	2	0,2		2	24	+
AYD-BG 7	2	0,2		1	36	+
AYD-BG 8	2	0,2		2	18	+
ALG-BG 9	2	0,2		2	24	+
ALG-BG 10	2	0,2		2	24	+
ALN-BG 11	2	0,2		1	18	+
ALN-BG 12	2	0,2		2	24	+

Kết quả ở bảng 5 cho thấy trong 9 / 12 chủng có độc lực mạnh, giết chết 100% chuột thí nghiệm trong thời gian từ 18- 36 giờ; 3/12 chủng giết chết 50% chuột thí nghiệm trong thời gian từ 18- 48 giờ với số lượng vi khuẩn gây nhiễm là $7,7 \times 10^8$ CFU.

Tất cả số chuột sau khi chết mổ khám kiểm tra bệnh tích đều thấy phổi sưng xuất huyết phù nề, viêm dính giai đoạn đầu; phân lập lại được vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* thuần khiết từ máu tim. Kết quả này cho thấy vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được đều có độc lực cao đối với chuột thí nghiệm và có thể là một trong những nguyên nhân gây bệnh đường hô hấp cho lợn ở Bắc Giang.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả của một số tác giả như Đặng Xuân Bình và cs (2007) đã thử độc lực trên 15 chuột và tỷ lệ chuột chết là 100%; Nguyễn Thị Thu Hằng (2010) kiểm tra độc lực của 10 chủng *A. pleuropneumoniae* trên chuột đều gây chết 100% trong thời gian từ 18 - 48 giờ, trong đó có 2/10 chủng gây chết chuột sau 18 giờ; 7/10 chủng gây chết chuột sau 24 giờ và 1/10 chủng gây chết chuột sau 48 giờ.

IV. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu 245 mẫu bệnh phẩm của lợn dương tính với virus PRRS tại Bắc Giang cho thấy:

- Tỷ lệ phân lập được vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* là tương đối cao (19,59%), trong đó cao nhất là bệnh phẩm ở lợn sau cai sữa từ 1,5-3 tháng tuổi (26,67%).

- Đã xác định có 35 chủng *A. pleuropneumoniae* phân lập được thuộc serotype 2 (72,92%); 10 chủng serotype 5a (20,83%) và 3 chủng serotype 5b (6,25%).
- Các chủng *A. pleuropneumoniae* phân lập được đều có đặc tính sinh vật học điển hình phù hợp với tài liệu trong và ngoài nước đã công bố.
- Các chủng *A. pleuropneumoniae* phân lập được đều có độc lực cao, trong đó có 9/12 chủng gây chết 100% chuột thí nghiệm sau 18-36 giờ và 3/12 chủng gây chết 50% chuột thí nghiệm sau 18-48 giờ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Xuân Bình, Nguyễn Thị Ngân, Phan Hồng Phúc (2007), “Tình hình nhiễm *Actinobacillus pleuropneumoniae* và bệnh viêm phổi màng phổi ở lợn”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 14 (2), tr. 56-59.
2. Cục thống kê tỉnh Bắc Giang (2010), Thống kê chăn nuôi của tỉnh tại thời điểm ngày 01/10/2010.
3. Nguyễn Thị Thu Hằng, Đỗ Ngọc Thúy, Cù Hữu Phú, Trương Văn Dung, Nguyễn Xuân Huyền, Vũ Ngọc Quý (2009), “Kết quả thiết lập phản ứng PCR để giám định nhanh vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* phân lập được từ lợn nuôi tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y* (3), tr. 45-49.
4. Nguyễn Thị Thu Hằng (2010), Nghiên cứu một số đặc tính sinh học và tính sinh miễn dịch của *Actinobacillus pleuropneumoniae* phân lập từ lợn làm cơ sở cho việc chế tạo vaccin, Luận án Tiến sỹ Nông nghiệp, Viện Thú y quốc gia, Hà Nội.
5. Trịnh Quang Hiệp, Cù Hữu Phú, Nguyễn Thu Hằng, Âu Xuân Tuấn (2004), “Xác định đặc tính sinh vật hoá học, độc lực của vi khuẩn *Actinobacillus*, *Pasteurella* và *Streptococcus* gây bệnh viêm phổi ở lợn”, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ, Bộ Nông nghiệp và PTNT* (4), tr. 476-477.
6. Cù Hữu Phú, Nguyễn Ngọc Nhiên, Nguyễn Thu Hằng, Âu Xuân Tuấn, Nguyễn Bích Thủy, Vũ Ngọc Quý, Phạm Bảo Ngọc (2004), “Xác định nguyên nhân gây bệnh đường hô hấp của lợn nuôi tại một số tỉnh phía Bắc”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 7(4), tr. 23-32.
7. Cù Hữu Phú, Yoshikazu, Nguyễn Thị Bích Thủy, Nguyễn Thúy Duyên (2005), “Tình chế kháng nguyên đặc hiệu serotype của *A. pleuropneumoniae* và một số đặc tính của chúng”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y* (1), tr. 12-18
8. Chiers K, Donne E, Van Overbeke I, Ducatelle R, Haesebrouck F. (2002), *Actinobacillus pleuropneumoniae* infectious in closed swine herds. Infectious patterns and serological profiles. Elsevier science B.V. in Ghent University Belgium.
9. Moller K, Nielsen R., Andersen LV, Killian M. (1996), Clonal analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* population in a geographically, restricted area by multilocus enzyme electrophoresis, *J. Clin Micro* 30, p. 623 - 627.