

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VI KHUẨN *SALMONELLA* PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ LỢN SAU CAI SỮA BỊ TIÊU CHẢY VÀ CHẾ TẠO THỬ NGHIỆM VACXIN PHÒNG BỆNH

Trần Đức Hạnh
Công ty Marphavet

Tóm tắt

Qua xét nghiệm 479 mẫu phân và phủ tạng lợn cai sữa bị tiêu chảy tại các địa phương 5 tỉnh miền bắc Việt Nam, kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm *Salmonella* là 40,92%.

- Tỷ lệ phân lập được *Salmonella* cao nhất ở hạch màng treo ruột (59,57%), chất chứa ruột non (53,19%) sau đó là lách (40,43%), gan (34,04%), và thấp nhất là máu tim (25,53%).

- Các chủng *Salmonella* phân lập được mang đầy đủ các đặc tính sinh học của vi khuẩn *Salmonella* như các tài liệu trong và ngoài nước đã mô tả.

- Kết quả định chủng cho thấy có 6 serotyp : *S. choleraesuis* (15,32%), *S. typhimurium* (40,43%) , *S. enteritidis* (22,13%), *S. derby* (7,23%), *S. risen* (5,96%), *S. anatum* (2,28%) và *S. Stanley* (6,81%).

- Về độ mẫn cảm kháng sinh: các chủng *Salmonella* phân lập được mẫn cảm với Ofloxacin và Norfloxacin (100%), tiếp đến là Ciprofloxacin (90%) và Neomycin (80%). Kháng hoàn toàn với Trimethoprim + Sulfamethoxazole (100%) và kháng cao với một số kháng sinh như: Cefazolin (80%) và Spectinomycin (75%).

- Về yếu tố gây bệnh 100% các chủng *S. choleraesuis* được kiểm tra: 100% có mang gen Stn và InvA; 100% *S. typhimurium* gen Stn và 93,69% mang gen InvA; 92,31% *S. enteritidis* mang gen Stn và 82,69% mang gen InvA. Không có chủng vi khuẩn nào mang gen DT104.

- Tất cả các chủng vi khuẩn đem thử đều có độc lực cao, gây chết 100% chuột thí nghiệm trong vòng 8 - 36 giờ sau khi tiêm, giết chết hết lợn gây bệnh thí nghiệm trong vòng 28 - 96 giờ.

- Cả 3 lô canh trùng *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* và *S. enteritidis* dùng chế tạo vaccin đều đạt các chỉ tiêu về: Độ đậm, thuần khiết, vô trùng, đủ tiêu chuẩn dùng làm vaccin. Lô vaccin được chế từ 3 chủng trên đạt chỉ tiêu an toàn 100% và có hiệu lực bảo hộ 100% trên chuột nhắt trắng.

Từ khóa: Lợn cai sữa, *Salmonella*, Tỷ lệ nhiễm, Serotyp, Gen, Độ mẫn cảm kháng sinh, Vaccin

Characterization of *Salmonella* isolated from weaned and diarrhea affected pigs and experimental vaccine production

Trần Đức Hạnh

Summary

The examination of 479 fecal and visceral samples of weaned and diarrhea affected pigs in 5 provinces of the North Vietnam resulted in isolation of *Salmonella* in 40.92% of the samples.

The rate of isolation varied according to the samples nature, as such 59.57% from mesenteric lymph nodes, 53.19% from small intestine content, 40.43% from the spleen, 34.04% from the liver and 25.53% from the heart blood.

The bacterium showed all the characteristics of *Salmonella* as described elsewhere.

The serotyping resulted in 6 serovars i.e. *S. choleraesuis* (15.32%), *S. typhimurium* (40.43%) , *S. enteritidis* (22.13%), *S. derby* (7.23%), *S. risen* (5.96%), *S. anatum* 2.28%) and *S. stanley* (6.81%).

Concerning the antibiotic susceptibility: the isolates were found susceptible to Ofloxacin and Norfloxacin (100%), followed by Ciprofloxacin (90%) and Neomycin (80%) and totally resistant to Trimethoprim + Sulfamethoxazole (100%) and partially resistant to Cefazolin (80%) and Spectinomycin (75%).

All the isolates of *S. choleraesuis* (100%) had the gen Stn and InvA; also all (100%) isolates of *S. typhimurium* had the gen Stn and 93.69% had the gen InvA; *S. enteritidis* 92.31% had gen Stn and 82.69% had the gen InvA. The gen DT104 was not found in none of the isolates.

All the isolates were highly pathogen for white mice which died with 8 to 36 hours after inoculation and for pigs which died within 28 – 96 hours after inoculation.

All the three batch of culture of *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* and *S. enteritidis* was used for preparing vaccine. The vaccine had met the provided requirements on antigen concentration, the purity, the sterility, the safety (100% for white mice) and the vaccine efficacy (100%, also tested in white mice).

Key words: Weaned pig, Diarrhea, *Salmonella*, Prevalence, Serotype, Gen, Antibiotic resistance, Vaccine

I. MỞ ĐẦU

Ở nước ta, nghề chăn nuôi lợn đã có từ lâu đời và ngày càng phát triển, một số lĩnh vực như chọn tạo giống, thức ăn dinh dưỡng, kỹ thuật chăm sóc, vệ sinh thú y và phòng chống bệnh đã được chú trọng trong những năm gần đây nên năng suất và chất lượng đàn lợn được nâng cao. Tuy nhiên, cùng với sự phát triển chăn nuôi thì tình hình dịch bệnh cũng đang diễn biến hết sức phức tạp, một số dịch bệnh nguy hiểm như bệnh tai xanh, lở mồm long móng... hàng năm làm chết nhiều lợn và gây thiệt hại lớn cho người chăn nuôi. Bệnh gây thiệt hại lớn về kinh tế, hay gặp và phổ biến ở lợn con là bệnh tiêu chảy. Bệnh được gọi là hội chứng tiêu chảy do nhiều nguyên nhân gây nên và nhiều yếu tố bất lợi khác tác động như sự thay đổi đột ngột của thời tiết, khí hậu, kết hợp với những sai sót trong chăm sóc, nuôi dưỡng, cùng với điều kiện môi trường chăn nuôi bị ô nhiễm, vệ sinh kém, tạo điều kiện cho các vi sinh vật gây bệnh phát triển. Một trong những bệnh thường gặp phải kể đến là bệnh tiêu chảy do vi khuẩn *Salmonella* gây ra ở lợn, còn gọi là bệnh phó thương hàn, tuy không nổ ra thành dịch lớn, nhưng với đặc điểm dịch tễ hết sức phức tạp, đã và đang gây nên những thiệt hại đáng kể cho người chăn nuôi. Vì vậy việc phân lập vi khuẩn *Salmonella*, xác định serotyp và các đặc tính gây bệnh của chúng ở lợn, nhằm mục đích phát hiện sớm và tìm ra hướng phòng và trị bệnh có hiệu quả là những việc làm hữu ích cần thiết.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập vi khuẩn *Salmonella* từ lợn sau cai sữa bị tiêu chảy nuôi tại một số tỉnh phía Bắc và xác định tỷ lệ phân lập vi khuẩn *Salmonella* ở các cơ quan phủ tạng của lợn bệnh.
- Xác định một số đặc tính sinh vật hóa học, serotyp và xác định khả năng miễn cảm kháng sinh của các chủng vi khuẩn phân lập.

- Xác định một số yếu tố gây bệnh của các chủng vi khuẩn phân lập, khả năng sản sinh độc tố, khả năng xâm nhập và khả năng kháng kháng sinh.
- Xác định độc lực của các chủng vi khuẩn phân lập và gây bệnh thực nghiệm.
- Xác định hiệu lực phòng bệnh của vacxin được chế tạo từ vi khuẩn *Salmonella* phân lập trên động vật thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp lấy mẫu

- Nghiên cứu dịch tễ: lập các biểu điều tra thống kê ngẫu nhiên ở các trang trại và các hộ chăn nuôi lợn.

2.2.2. Phương pháp nuôi cấy, phân lập vi khuẩn *Salmonella* spp

Trên cơ sở quy trình phân lập và giám định vi khuẩn của Khoa thú y ứng dụng và sức khỏe cộng đồng, trường Đại học nông nghiệp và thú y Obihiro, Nhật Bản, với một số cải tiến để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm tại Việt Nam.

2.2.3. Phương pháp giám định vi khuẩn *Salmonella* phân lập được

Kiểm tra hình thái học. Kiểm tra khả năng di động. Phản ứng sinh Indol

Phản ứng Oxidaza. Phản ứng Catalaza. Phản ứng lên men đường

2.2.4. Phương pháp xác định serotyp của vi khuẩn *Salmonella* phân lập

Xác định serotyp của các chủng *Salmonella* phân lập bằng các phản ứng ngưng kết trên phiến kính và trong ống nghiệm bằng kháng huyết thanh chuẩn (hãng Denka Seiken Co., Ltd. Tokyo, Nhật Bản) đối với kháng nguyên thân O và kháng nguyên lông H. Trên cơ sở kết quả thu được, tiến hành định danh chủng vi khuẩn kiểm tra dựa vào bảng phân loại Kauffmann và White (Popoff, 2001).

- *Xác định nhóm kháng nguyên O bằng kháng huyết thanh đa giá nhóm O*

Sử dụng phản ứng ngưng kết nhanh trên phiến kính (Rapid Slide Agglutination) để xác định nhóm kháng nguyên O của vi khuẩn *Salmonella*.

- *Xác định kháng nguyên O bằng kháng huyết thanh đơn giá nhóm O*

Các chủng cho kết quả dương tính với kháng huyết thanh O đa giá, tiếp tục được xác định với các kháng huyết thanh đơn giá.

- *Xác định kháng nguyên H của vi khuẩn *Salmonella* (pha 1) và (pha 2)*

2.2.5. Phương pháp xác định khả năng miễn cảm với kháng sinh

Sử dụng phương pháp của Kirby- Bauer và đánh giá kết quả thử khả năng miễn cảm của vi khuẩn với kháng sinh dựa vào bảng đánh giá của NCCLS –2000 Mỹ (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

2.2.6. Phương pháp xác định một số yếu tố gây bệnh của các chủng *Salmonella* bằng phương pháp PCR

2.2.7. Xác định độc lực của chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập

- Trên chuột bạch theo phương pháp Sawada (1984)
- Trên lợn bằng gây bệnh thực nghiệm: lợn 35 ngày tuổi khỏe mạnh, có trọng lượng tương đương nhau, chưa tiêm vacxin phó thương hàn.
- Chủng vi khuẩn *Salmonella* được nuôi cấy trong môi trường nước thịt, bồi dưỡng ở 37°C trong 24 giờ. Xác định số lượng vi khuẩn có trong 1 ml canh trùng bằng phương pháp đếm số lượng khuẩn lạc trên thạch.
- Mỗi lợn được bơm 10 ml canh trùng vào thực quản và tiêm 6 ml vào xoang phúc mạc với mỗi chủng *Salmonella* ($\approx 10^9$ CFU/ml). Mỗi chủng vi khuẩn gây bệnh 2 lợn.
- Theo dõi thời gian chết, mổ khám bệnh tích và phân lập lại vi khuẩn.

2.2.8. Phương pháp chế tạo vaccin vô hoạt có bổ trợ keo phèn

Vaccin vô hoạt có bổ trợ keo phèn được chế theo phương pháp thường quy của Bộ môn vi trùng - Viện thú y. Vaccin được kiểm nghiệm theo quy trình vaccin vô hoạt có bổ trợ keo phèn của Trung tâm kiểm nghiệm thuốc thú y TÚ I.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các kết quả thu được trong các thí nghiệm được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học và phần mềm Excel.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Salmonella*

3.1.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Salmonella* từ các mẫu bệnh phẩm

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Salmonella* từ các mẫu phân và phủ tạng

TT	Địa điểm lấy mẫu	Số mẫu kiểm tra	Kết quả phân lập <i>Salmonella</i>	
			Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
1	Bắc Giang	210	72	34,29
2	Hưng Yên	46	19	41,30
3	Hà Nội	65	31	47,69
4	Phú Thọ	80	41	51,25
5	Thái Nguyên	78	33	42,31
Tổng		479	196	40,92

Bảng 1 cho thấy: trong tổng số 479 mẫu phân và phủ tạng thu thập được, có 196 mẫu đã phân lập được vi khuẩn *Salmonella*, chiếm tỷ lệ trung bình là 40,92%. Tỷ lệ phân lập *Salmonella* cao nhất ở Phú Thọ (51,25%), tiếp đến là Hà Nội (47,69%), Thái Nguyên (42,31%), Hưng Yên (41,30%), và thấp nhất là ở Bắc Giang (34,29%). Tuy nhiên, sự sai khác giữa các địa phương là không có ý nghĩa ($P > 0,05$).

Theo chúng tôi, sự khác nhau này có thể do rất nhiều nguyên nhân như thức ăn, chuồng trại, điều kiện chăm sóc nuôi dưỡng, tiêm phòng vắc xin, thời điểm nghiên cứu... Những năm gần đây, thức ăn công nghiệp được sử dụng rộng rãi đã cung cấp khá đầy đủ các chất dinh dưỡng cho lợn, đồng thời cũng đảm bảo an toàn về vệ sinh, hạn chế bị nhiễm vi sinh vật.

3.1.2. Tỷ lệ phân lập vi khuẩn *Salmonella* ở một số cơ quan phủ tạng của lợn bệnh

Bảng 2. Kết quả phân lập vi khuẩn *Salmonella* ở một số cơ quan phủ tạng của lợn bệnh

Loại bệnh phẩm	Số mẫu kiểm tra	Kết quả phân lập <i>Salmonella</i>	
		Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Máu tim	47	12	25,53
Gan	47	16	34,04
Lách	47	19	40,43
Hạch màng treo ruột	47	29	59,57
Chất chứa ruột non	47	25	53,19
Tổng	235	101	42,98

Khi lợn bị tiêu chảy, không chỉ tìm thấy vi khuẩn *Salmonella* trong phân, mà còn tìm thấy vi khuẩn *Salmonella* ở các cơ quan phủ tạng khác.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, tỷ lệ phân lập vi khuẩn *Salmonella* cao nhất ở hạch màng treo ruột (59,57%), sau đó là ở chất chứa ruột non (53,19%), lách (40,43%), gan (34,04%), thấp nhất là ở máu tim (25,53%). Tỷ lệ phân lập bình quân ở các loại cơ quan phủ tạng của lợn bệnh là 42,98%.

Ở lợn sau cai sữa bị tiêu chảy có thể tìm thấy *Salmonella* ở trong hạch màng treo ruột và chất chứa ruột non với tỷ lệ khá cao và có mặt ở hầu hết các cơ quan phủ tạng, điều này cho thấy rõ vai trò của vi khuẩn *Salmonella* trong bệnh tiêu chảy của lợn.

3.2. Kết quả giám định một số đặc tính nuôi cấy và sinh hóa của các chủng *Salmonella* phân lập

Giám định một số đặc tính nuôi cấy của các chủng phân lập trên các môi trường khác nhau, kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra một số đặc tính nuôi cấy của các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập được

Chỉ tiêu kiểm tra	Số chủng	Đặc điểm	Kết quả (+)	Tỷ lệ (%)
BPW	235	Mọc tốt, đục đều	235	100,0
RV	235	Mọc tốt, làm nhạt màu môi trường	235	100,0
Thạch DHL	235	Khuẩn lạc ở giữa đen, xung quanh trong suốt, hoặc khuẩn lạc trong suốt không màu, dạng S	235	100,0
Thạch CHROM TM <i>Salmonella</i>	235	Khuẩn lạc có màu tím hồng, dạng S	235	100,0
Thạch TSI	235	Phần môi trường mặt nghiêng có màu đỏ; dưới đáy có màu vàng; phần giữa có màu đen hoặc không đen, sinh hơi	235	100,0
Thạch LIM	235	Môi trường có màu tím	235	100,0
Malonate	235	Không chuyển màu môi trường	235	100,0

Kết quả ở bảng 3 cho thấy: 100% số chủng vi khuẩn khi nuôi cấy vào môi trường tăng sinh như BPW, RV đều mọc rất tốt, chúng làm đục môi trường, dưới đáy ống nghiệm có cặn, sau 24 giờ mặt môi trường có màng mỏng và 100% số chủng vi khuẩn khi nuôi cấy trên môi trường thạch DHL tạo khuẩn lạc ở giữa màu đen, xung quanh trong suốt. Trên môi trường thạch CHROMTM *Salmonella*, khuẩn lạc có màu tím hồng, dạng S.

Tất cả 235 chủng *Salmonella* đều mọc và phát triển tốt trên môi trường TSI, có hoặc không sản sinh H₂S. Tất cả các chủng không chuyển màu môi trường LIM (môi trường LIM vẫn có màu tím), có nghĩa là dương tính đối với phản ứng Lysine (thủy phân Lysine), và có 100% số chủng không làm chuyển màu môi trường Malonate.

Sau khi xác định đặc tính nuôi cấy của các chủng vi khuẩn *Salmonella* trên, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra một số đặc tính sinh hóa của chúng. Cả 235 chủng đem kiểm tra đều lên men sinh hơi các đường glucoze, mantol, sorbitol, dextroze, galactoze, manitol, arabinoze...nhưng không lên men đường lactoze, sucroze. Tất cả các chủng *Salmonella* phân lập được đều không sản sinh indol, phản ứng oxidaza âm tính, catalaza dương tính. Như vậy, đặc tính sinh vật hoá học của các chủng *Salmonella* phân lập mang đặc

điểm chung của chi *Salmonella* và phù hợp với những đặc điểm về hình thái, nuôi cấy, đặc tính sinh hoá của vi khuẩn này theo như mô tả của Quinn và cs (2001).

Bảng 4. Kết quả giám định một số đặc tính sinh hoá của các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập

TT	Chỉ tiêu kiểm tra	Số lượng mẫu	Kết quả (+)	Tỷ lệ (%)	Theo Ewing Edwards (1970)
1	Indol	235	0	0	-
2	Oxidaza	235	0	0	-
3	Catalaza	235	235	100,0	+
4	H ₂ S	235	114	87,69	
5	Di động	235	235	100,0	+
6	Glucose	235	235	100,0	+
7	Mantol	235	235	100,0	+
8	Lactose	235	0	0	-
9	Sorbitol	235	235	100,0	+
10	Dextrose	235	235	100,0	+
11	Sucrose	235	0	0	-
12	Galactose	235	235	100,0	+
13	Manitol	235	235	100,0	+
14	Arabinose	235	235	100,0	+

3.4. Kết quả xác định serotyp của các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập

Tiến hành xác định serotyp của các chủng *Salmonella* phân lập bằng các phản ứng ngưng kết trên phiến kính và trong ống nghiệm, sử dụng kháng huyết thanh chuẩn (của hãng Denka Seiken Co., Ltd. Tokyo, Nhật Bản) đối với kháng nguyên thân O và kháng nguyên lông H của vi khuẩn *Salmonella* và đối chiếu theo bảng phân loại của Kauffmann and White (Popoff, 2001). Để xác định serotyp của vi khuẩn *Salmonella*, nên lấy khuẩn lạc phát triển ở phần nghiêng của thạch TSI hoặc từ môi trường thạch thường. Trước hết, kiểm tra với kháng nguyên nhóm O, sau đó là kháng huyết thanh nhóm H.

Bảng 5. Kết quả xác định serotyp của các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập

Số chủng kiểm tra	Serotyp	Công thức kháng nguyên			Kết quả	
		KNO	KNH		Số chủng (+)	Tỷ lệ (%)
			Pha1	Pha2		
n = 235	<i>S. choleraesuis</i>	6,7	C	1,5	36	15,32
	<i>S. typhimurium</i>	4,5,12	I	1,2	95	40,43
	<i>S. enteritidis</i>	9,12	m,g	-	52	22,13
	<i>S. derby</i>	4	f,g	1,2	17	7,23
	<i>S. rissen</i>	7	f,g	-	14	5,96
	<i>S. anatum</i>	3,10	e,h	1,6	5	2,28
	<i>S. stanley</i>	4	D	1,2	16	6,81

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, trong 235 chủng *Salmonella* nghiên cứu, có 36 chủng là *S. choleraesuis*, chiếm 15,32%; 95 chủng là *S. typhimurium*, chiếm 40,43%; 52 chủng là

S. enteritidis, chiếm 22,13%; 17 chủng là *S. derby*, chiếm 7,23%; 14 chủng là *S. rissen* chiếm 5,96%; 5 chủng là *S. anatum* chiếm 2,28% và 16 chủng là *S. stanley* chiếm tỷ lệ 6,81%. Các serotyp chiếm tỷ lệ cao xác định được trong nghiên cứu này như *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* đều nằm trong số những chủng thường gặp nhất từ những trường hợp nhiễm bệnh *Salmonella* lâm sàng ở lợn. Việc phát hiện ra một tỷ lệ cao *S. typhimurium*, *S. enteritidis* và *S. choleraesuis* ở lợn bị tiêu chảy và chết đã thể hiện được vai trò của các serotyp này trong bệnh phó thương hàn của lợn.

3.5. Kết quả kiểm tra mức độ mẫn cảm của các chủng *Salmonella* phân lập với một số loại kháng sinh

Chúng tôi cũng chọn ngẫu nhiên 20 chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập để kiểm tra mức độ mẫn cảm với 10 loại kháng sinh và hóa dược thông dụng, tiến hành kiểm tra và đánh giá theo phương pháp của Kirby- Bauer. Các mẫu giấy kháng sinh do hãng OXOID sản xuất.

Bảng 6. Kết quả kiểm tra mức độ mẫn cảm với một số loại kháng sinh của các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập

TT	Tên kháng sinh	Số chủng kiểm tra	Mẫn cảm cao		Mẫn cảm trung bình		Kháng	
			(+)	(%)	(+)	(%)	(+)	(%)
1	Neomycin	20	16	80,0	4	20,0	0	0,0
2	Spectinomycin	20	0	0,0	5	25,0	15	75,0
3	Amikacin	20	12	60,0	6	30,0	2	10,0
4	Ofloxacin	20	20	100,0	0	0,0	0	0,0
5	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	20	0	0,0	0	0,0	20	100,0
6	Gentamycin	20	5	25,0	10	50,0	5	25,0
7	Norfloxacin	20	20	100,0	0	0,0	0	0,0
8	Cefuzoxime	20	5	25,0	9	45,0	6	30,0
9	Cephazolin	20	2	10,0	2	10,0	16	80,0
10	Ciprofloxacin	20	18	90,0	2	10,0	0	0,0

Kết quả bảng 6 cho thấy: Các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập đều kháng hoàn toàn với Trimethoprim/Sulfamethoxazole (100%) và kháng cao với một số kháng sinh như: Cefazolin (80%) và Spectinomycin (75%). Bên cạnh những kháng sinh đã bị kháng với tỷ lệ cao, các chủng vi khuẩn *Salmonella* được thử vẫn rất mẫn cảm với Ofloxacin và Norfloxacin (với tỷ lệ 100%), tiếp sau là Ciprofloxacin (90%) và Neomycin (80%). Vì yếu tố kháng kháng sinh và hóa dược của vi khuẩn *Salmonella* luôn luôn thay đổi theo thời gian, không gian khác nhau ở từng cá thể. Vì vậy, trong từng thời gian nhất định, cần phải làm kháng sinh đồ để xác định chính xác khả năng kháng kháng sinh của các vi khuẩn gây bệnh, ngoài mục đích lựa chọn kháng sinh mẫn cảm trong điều trị, còn để kiểm tra khả năng gây bệnh và độc lực của chủng vi khuẩn phân lập.

3.6. Kết quả xác định một số yếu tố gây bệnh của các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập

Để xác định một số yếu tố gây bệnh của các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập, chúng tôi đã tiến hành xác định khả năng sản sinh độc tố, yếu tố xâm nhập và khả năng kháng kháng sinh của chúng, đã sử dụng phương pháp PCR để xác định một số yếu tố

độc lực của vi khuẩn *Salmonella*. Các cặp mồi mà chúng tôi sử dụng cho phản ứng PCR để xác định một số yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn *Salmonella* là: Stn-F và Stn-R dùng để xác định gen sản sinh độc tố đường ruột Stn (cho kích cỡ sản phẩm là 259 bp), InvA-F và InvA-R để xác định gen quyết định yếu tố xâm nhập InvA (cho sản phẩm là 521 bp), 104SR-F và 104SR-R dùng để xác định gen kháng kháng sinh DT104 (cho sản phẩm là 162 bp). Các bước tiến hành phản ứng PCR như đã mô tả ở phần nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu.

Bảng 7. Kết quả kiểm tra một số yếu tố gây bệnh của các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập

TT	Serotyp	Số chủng kiểm tra	Yếu tố gây bệnh					
			Stn		InvA		DT104	
			(+)	(%)	(+)	(%)	(+)	(%)
1	<i>S. choleraesuis</i>	36	36	100,0	36	100,0	0	0
2	<i>S. typhimurium</i>	95	95	100,0	89	93,68	0	0
3	<i>S. enteritidis</i>	52	48	92,31	43	82,69	0	0
	Tổng	183	179	97,81	168	91,80	0	0

Trong tổng số 183 chủng *Salmonella* được kiểm tra, có 179 chủng mang gen Stn (chiếm tỷ lệ 97,81%), 168 chủng mang gen InvA (chiếm 91,80%) và không có chủng nào mang yếu tố DT104.

- 100% các chủng *S. choleraesuis* được kiểm tra có mang gen Stn và InvA
- Trong số 95 chủng *S. typhimurium* được kiểm tra thì 100% các chủng có chứa gen Stn và 93,68% các chủng có chứa gen InvA
- Có 92,31% các chủng *S. enteritidis* được kiểm tra có gen Stn và 82,69% các chủng có gen InvA. Không có chủng vi khuẩn nào đem kiểm tra có mang yếu tố DT104.

Từ kết quả này cho thấy: hầu hết các chủng *Salmonella* có khả năng sản sinh độc tố đường ruột (97,81%) đều mang yếu tố xâm nhập (93,80%). Các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập chưa mang gen kháng kháng sinh.

Bảng 8. Kết quả kiểm tra độc lực của một số chủng *Salmonella* phân lập

Ký hiệu chủng	Số chuột tiêm (con)	Liều tiêm (ml)	Đường tiêm	Số chuột chết (con)	Tỷ lệ (%)	Thời gian chết (giờ)	Phân lập lại VK
S1	2	0,2	Phúc xoang	2	100,0	8-16	+
S2	2	0,2		2	100,0	<8	+
S3	2	0,2		2	100,0	14-16	+
S4	2	0,2		2	100,0	<8	+
S5	2	0,2		2	100,0	18-24	+
S6	2	0,2		2	100,0	24	+
S7	2	0,2		2	100,0	16	+
S8	2	0,2		2	100,0	<8	+
S9	2	0,2		2	100,0	24-36	+
S10	2	0,2		2	100,0	16-24	+
S11	2	0,2		2	100,0	24	+

S12	2	0,2		2	100,0	24-36	+
S13	2	0,2		2	100,0	16	+
S14	2	0,2		2	100,0	16	+
S15	2	0,2		2	100,0	20-24	+
S16	2	0,2		2	100,0	20	+
S17	2	0,2		2	100,0	<8	+
S18	2	0,2		2	100,0	16	+
S19	2	0,2		2	100,0	16	+
S20	2	0,2		2	100,0	8-16	+

Chúng tôi chọn ngẫu nhiên 20 chủng *Salmonella* phân lập thuộc cả 3 serotyp *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* và *S. enteritidis* từ 5 địa phương, đánh số từ S1 đến S20 để thử độc lực bằng cách tiêm truyền qua chuột nhắt trắng. Các chủng được nuôi cấy trong môi trường BHI ở 37°C trong 18- 24 giờ, đếm số lượng vi khuẩn có trong 1 ml canh trùng bằng phương pháp đếm số lượng khuẩn lạc trên thạch. Mỗi chủng tiêm cho 2 chuột, mỗi chuột 0,2 ml ($\approx 4 \times 10^7$ vi khuẩn) canh trùng vào phúc xoang. Theo dõi thời gian chuột chết. Các chuột chết được tiến hành mổ khám, lấy máu tim để nuôi cấy phân lập vi khuẩn.

Kết quả ở bảng 8 cho thấy: Sau khi tiêm canh trùng vi khuẩn *Salmonella*, tất cả các chủng vi khuẩn đem thử đều gây chết 100% chuột thí nghiệm trong vòng 8 – 36 giờ sau tiêm, trong đó có 14 chủng gây chết 100% chuột trong thời gian từ 8 - 24 giờ, 2 chủng gây chết chuột sau 24 giờ, đặc biệt có 4 chủng giết chết chuột trước 8 giờ. Mổ khám những chuột chết, lấy máu tim nuôi cấy phân lập vi khuẩn thì đều tìm thấy vi khuẩn *Salmonella* thuần khiết. Như vậy, có thể thấy các chủng *Salmonella* phân lập đều có độc lực khá cao và là nguyên nhân gây chết cho lợn bị tiêu chảy.

3.7 Kết quả gây bệnh thực nghiệm trên lợn bằng các chủng *Salmonella* phân lập

Chúng tôi đã chọn 6 chủng vi khuẩn *Salmonella*, trong đó có 2 chủng *S. choleraesuis*, 2 chủng *S. typhimurium* và 2 chủng *S. enteritidis*. Các chủng này có thời gian giết chết chuột từ 8- 16 giờ, đều có khả năng xâm nhập và đều sản sinh độc tố. Đặc tính của các chủng này được trình bày ở bảng 9.

Bảng 9. Các chủng vi khuẩn *Salmonella* chọn gây bệnh

TT	Kí hiệu chủng	Cơ quan phân lập	Địa điểm	Thời gian gây chết chuột (giờ)	Yếu tố độc lực		
					S_{tn}	InvA	DT_{104}
1	HY-S7	Gan	Hưng Yên	16	+	+	-
2	HN-S8	Lách	Bắc Giang	<8	+	+	-
3	BG-S1	Lách	Bắc giang	8-16	+	+	-
4	BG-S2	Gan	Bắc Giang	<8	+	+	-
5	PT-S17	Hạch ruột	Phú Thọ	<8	+	+	-
6	TN-S18	Gan	Thái Nguyên	16	+	+	-

Thí nghiệm được bố trí như sau: Chọn 14 lợn với tiêu chuẩn: Lợn 35 ngày tuổi, khỏe mạnh, có trọng lượng tương đương nhau, chưa tiêm vacxin phòng bệnh do *Salmonella* gây ra và âm tính với kháng thể kháng *Salmonella*. Tiến hành chia làm 2 lô: lô thí

thí nghiệm có 12 con và lô đối chứng 2 con. Ở lô thí nghiệm, lợn được tiêm đồng thời vào phúc xoang 6 ml và cho uống 10 ml canh trùng các chủng *Salmonella* tương ứng đã nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ (1 ml canh trùng $\approx 1 \times 10^9$ vi khuẩn). Mỗi chủng vi khuẩn gây bệnh cho 2 lợn. Lợn ở lô đối chứng được tiêm và cho uống môi trường nước thịt vô trùng với các liều tương tự. Theo dõi lợn hàng ngày sau khi gây bệnh. Kết quả thu được trình bày ở bảng 10.

Bảng 10. Kết quả gây bệnh thực nghiệm *Salmonella* trên lợn 35 ngày tuổi

Chủng vi khuẩn	Kí hiệu chủng	Số lợn gây bệnh (con)	Đường gây bệnh	Liều canh trùng (ml)	Số lợn chết (con)	Thời gian chết (giờ)	Triệu chứng sau gây bệnh	Kết quả phân lập lại VK
<i>S. choleraesuis</i>	HY-S7	2	Uống	10	2	28-32	Chết có vết bầm đỏ tím ở rìa tai, chân, bụng, đuôi.	<i>S. choleraesuis</i>
			Xoang PM	6				
	HN-S8	2	Uống	10	2	48	Chết có vết bầm đỏ tím ở rìa tai, chân, bụng, đuôi.	<i>S. choleraesuis</i>
			Xoang PM	6				
<i>S. typhimurium</i>	BG-S1	2	Uống	10	2	48-72	Tiêu chảy nặng, chết.	<i>S. typhimurium</i>
			Xoang PM	6				
	BG-S2	2	Uống	10	2	68-72	Tiêu chảy nặng, chết	<i>S. typhimurium</i>
			Xoang PM	6				
<i>S. enteritidis</i>	PT-S17	2	Uống	10	2	60-72	Tiêu chảy nặng, chết	<i>S. enteritidis</i>
			Xoang PM	6				
	TN-S18	2	Uống	10	2	72-96	Tiêu chảy nặng, chết	<i>S. enteritidis</i>
			Xoang PM	6				
Đ/C		2	Uống	0	0	-	Bình thường	-
			Xoang PM	0				

(Ghi chú: 1ml canh trùng $\approx 10^9$ vi khuẩn)

Sau khi gây bệnh, tất cả lợn ở lô thí nghiệm (18/18 con) đều bị chết trong khoảng thời gian từ 28 - 96 giờ. Trong đó, cả 2 chủng vi khuẩn *S. choleraesuis* đều gây chết 100% lợn thí nghiệm trong vòng 28 - 48 giờ. Điều này chứng tỏ các chủng *S. choleraesuis* này có độc lực rất cao, gây bệnh cho lợn ở thể cấp tính. Các triệu chứng lâm sàng trước khi lợn chết bao gồm: cả 4 lợn đều sốt rất cao 42°C, toàn thân nổi mẩn đỏ, nhất là ở những vùng da mỏng như: rìa tai, mõm, vùng bụng, lợn ỉa chảy, phân dạng nước màu vàng, lẫn máu và chất nhầy. Lợn ốm bỏ ăn, thường uống nhiều nước.....Cả 4 lợn gây bệnh bằng các chủng *S. typhimurium* đều chết trong vòng 48-72 giờ. Tương tự, 4 lợn gây bệnh bằng các chủng *S. enteritidis* đều chết trong thời gian 60 - 96 giờ. Tất cả những lợn này đều bị tiêu chảy nặng sau 24 giờ gây bệnh. Tất cả lợn chết đều được mổ khám kiểm tra bệnh tích, lấy chất chứa ruột non, hạch ruột, gan, lách, máu tìm nuôi cấy trên các môi trường và đều phân lập lại được đúng loại vi khuẩn đã gây bệnh.

18 lợn mổ khám đều có lá lách sưng to, phần giữa sưng to hơn, dai như cao su, màu xanh thẫm, cắt ra có màu tím, thấy rõ nang lâm ba sưng to. Hạch lâm ba sưng, mềm, đỏ, thường đỏ thẫm từ chu vi lan vào giữa. Thận có điểm xuất huyết đỏ ở vỏ. Gan tụ máu, có nốt hoại tử bằng hạt kê. Niêm mạc dạ dày và ruột viêm đỏ, có điểm xuất huyết, có khi có nốt loét đỏ bằng hạt đậu. Phổi tụ máu, có các ổ viêm mới. Từ kết quả

gây bệnh ở trên cho thấy: tất cả 6 chủng vi khuẩn *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* được chọn để gây bệnh đều có độc lực rất cao và đều có khả năng gây bệnh đối với lợn.

3.8. Kết quả chế tạo thử nghiệm vaccin phòng bệnh *Salmonella* cho lợn

3.8.1 Chế vaccin vô hoạt có bổ trợ keo phèn phòng bệnh *Salmonella* cho lợn

Phòng bệnh bằng vaccin có thể coi là biện pháp khả thi nhất để khống chế các bệnh, trong đó có bệnh do *Salmonella* gây ra. Vaccin phổ thương hàn của các công ty, xí nghiệp thuốc thú y sản xuất hiện nay, hầu hết chỉ sử dụng duy nhất 1 loại kháng nguyên *S. choleraesuis*, do đó có khả năng chỉ phòng được bệnh phổ thương hàn thể do serotyp này gây ra ở lợn. Mục tiêu của chúng tôi trong nghiên cứu này là chế tạo 1 loại vaccin đa giá có các serotyp thường gặp nhất từ những trường hợp nhiễm bệnh *Salmonella* ở lợn ở một số tỉnh phía Bắc.

Căn cứ vào kết quả nghiên cứu, chúng tôi đã chọn 3 chủng *Salmonella* gồm các chủng *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* và *S. enteritidis* phân lập từ lợn mắc bệnh có độc lực cao, có cấu trúc kháng nguyên ổn định và mang một số yếu tố gây bệnh để sản xuất thử nghiệm vaccin phòng bệnh *Salmonella* cho lợn. Chúng tôi đã chế tạo vaccin dạng vô hoạt có bổ trợ keo phèn theo quy trình thường quy của Bộ môn vi trùng - Viện thú y. Các chủng vi khuẩn *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* và *S. enteritidis* được nuôi cấy riêng rẽ theo 3 lô khác nhau bằng phương pháp lên men, sục khí. Sau 8 - 10 giờ lên men, sục khí, lấy mẫu kiểm tra thuần khiết bằng nhuộm Gram và kiểm tra đậm độ vi khuẩn trong 1 ml canh trùng bằng phương pháp đếm số khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch, sau đó tiến hành vô hoạt vi khuẩn bằng Formol với nồng độ 0,5%.

Bảng 12. Kết quả kiểm tra một số chỉ tiêu các lô vaccin

Lô vaccin	Chỉ tiêu kiểm tra		
	Đậm độ (10^9 vk/ml)	Thuần khiết	Vô trùng
<i>S. choleraesuis</i>	19	Đạt	Đạt
<i>S. typhimurium</i>	22	Đạt	Đạt
<i>S. enteritidis</i>	16	Đạt	Đạt

Kết quả cho thấy:

- Với số lượng vi khuẩn yêu cầu trong 1 ml canh trùng để chế tạo vaccin phải đạt tối thiểu $1,5 \times 10^9$ vi khuẩn thì các lô canh trùng nuôi cấy đều đủ tiêu chuẩn chế vaccin.
- Cả 3 lô canh trùng đều đạt chỉ tiêu thuần khiết và canh trùng sau khi diệt Formol 0,5% đều đạt chỉ tiêu vô trùng khi kiểm tra trên các loại môi trường. Từ kết quả kiểm tra này cho thấy, cả 3 lô canh trùng đều đạt các chỉ tiêu cần thiết để có thể sử dụng làm vaccin.

4.8.2 Kết quả kiểm tra an toàn và hiệu lực vaccin trên chuột thí nghiệm

Sau khi đã kiểm tra canh trùng của các chủng vi khuẩn đều đạt các tiêu chuẩn dùng làm vaccin, tiến hành trộn lẫn các lô canh trùng với nhau theo tỷ lệ 1:1:1 để đạt được một loại canh trùng đồng nhất, điều chỉnh nồng độ của canh trùng, rồi bổ sung keo phèn với tỷ lệ 1/5 để đảm bảo 1ml vaccin có chứa $4 - 5 \times 10^9$ vi khuẩn. Vaccin được ra chai (20 ml/chai), đóng nút, gắn paraffin, dán nhãn, rồi lấy mẫu để kiểm tra an toàn và hiệu lực trên động vật thí nghiệm.

- Kiểm tra an toàn trên chuột nhắt trắng

Chọn 10 chuột khỏe mạnh, tiêm vaccin với liều 0,5 ml/con vào phúc xoang và 5 chuột được tiêm 0,2 ml/con nước trong ở phía trên lọ vaccin vào tĩnh mạch đuôi. Theo dõi

sau 7 ngày cho thấy tất cả chuột được tiêm vaccin đều sống khỏe mạnh, không con nào có biểu hiện phản ứng sau khi tiêm.

- Kiểm tra hiệu lực bảo hộ của vaccin trên chuột nhắt trắng

Chọn 10 chuột khỏe mạnh, mỗi chuột tiêm 0,2 ml vaccin vào dưới da và 5 chuột đối chứng không tiêm vaccin. Sau 21 ngày, tiến hành thử thách với hỗn hợp canh trùng *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* và *S. enteritidis* với liều 10LD₅₀ tương ứng với liều 0,5ml/con cho tất cả chuột thí nghiệm và chuột đối chứng.

Bảng13. Kết quả thử hiệu lực của vaccin trên chuột nhắt trắng

Lô vaccin	Số chuột tiêm (con)	Liều tiêm vaccin (ml)	Liều công (ml)	Thời gian theo dõi	Số chuột chết (con)	Số chuột sống	Tỷ lệ bảo hộ (%)
TN	10	0,2	0,5	7 ngày	0	10	100
Đ/C	5	0	0,5	24-48 giờ	5	0	0

Kết quả cho thấy: ở lô thí nghiệm, chuột được tiêm vaccin đều sống khỏe mạnh khi thử thách cường độc với hỗn hợp canh trùng *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* và *S. enteritidis*; trong khi đó, cả 5 chuột ở lô đối chứng đều bị chết trong vòng 24 giờ (tỷ lệ chết 100%) và đều phân lập lại được vi khuẩn *Salmonella* từ máu tim.

Tổng hợp các kết quả kiểm tra an toàn và hiệu lực bảo hộ của vaccin trên chuột bạch của lô vaccin chế thử, cho phép đánh giá: lô vaccin đạt chỉ tiêu an toàn 100% và có hiệu lực bảo hộ cao trên chuột bạch (100%), đủ tiêu chuẩn để tiến hành kiểm tra các bước tiếp theo để đánh giá hiệu quả sử dụng của vaccin trên bản động vật.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

. Tỷ lệ trung bình phân lập vi khuẩn *Salmonella* từ các mẫu phân và phủ tạng thu thập từ 5 địa phương khác nhau là 40,92%.

. Tỷ lệ phân lập *Salmonella* cao nhất ở hạch màng treo ruột (59,57%), chất chứa ruột non (53,19%), sau đó là lách (40,43%), gan (34,04%), và thấp nhất là máu tim (25,53%).

. Các chủng *Salmonella* phân lập mang đầy đủ các đặc tính sinh học của vi khuẩn *Salmonella* như các tài liệu trong và ngoài nước đã mô tả.

. Kết quả xác định serotyp cho thấy: 15,32% là *S. choleraesuis*; 40,43% là *S. typhimurium*; 22,13% là *S. enteritidis*; 7,23% là *S. derby*; 5,96% là *S. risen*; 2,28% là *S. anatum* và 6,81% là *S. stanley*.

. Các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập mẫn cảm với Ofloxacin và Norfloxacin (100%), tiếp đến là Ciprofloxacin (90%) và Neomycin (80%). Kháng hoàn toàn với Trimethoprim + Sulfamethoxazole (100%) và kháng cao với một số kháng sinh như: Cefazolin (80%) và Spectinomycin (75%).

. 100% các chủng *S. choleraesuis* được kiểm tra có mang gen Stn và InvA; 100% các chủng *S. typhimurium* có mang gen Stn và 93,69% các chủng có mang gen InvA; 92,31% các chủng *S. enteritidis* có mang gen Stn và 82,69% các chủng gen InvA. Không có chủng vi khuẩn nào mang gen DT104.

. Tất cả các chủng vi khuẩn đem thử đều có độc lực cao, gây chết 100% chuột thí nghiệm trong vòng 8 - 36 giờ sau khi tiêm.

. Cả 6 chủng vi khuẩn *Salmonella* chọn gây bệnh cho lợn đều có độc lực cao, giết chết hết lợn thí nghiệm trong vòng 28 - 96 giờ.

- . Cả 3 lô canh trùng *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* và *S. enteritidis* dùng chế tạo vaccin đều đạt các chỉ tiêu về: đậm độ, thuần khiết, vô trùng, đủ tiêu chuẩn dùng làm vaccin.
- . Lô vaccin được chế từ 3 chủng *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* và *S. enteritidis* đạt chỉ tiêu an toàn 100% và có hiệu lực bảo hộ 100% trên chuột nhắt trắng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Thị Trà An, Nguyễn Ngọc Tuấn, Lê Hữu Ngọc (2006), “Tình hình nhiễm *Salmonella* trong phân và thân thịt (bò, heo, gà) tại một số tỉnh phía Nam”, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, số 2, tr. 37-42.
2. Phùng Quốc Chương (2005), “Kết quả kiểm tra tính miễn cảm của một số thuốc kháng sinh của vi khuẩn *Salmonella* phân lập từ vật nuôi tại Đắk Lắk”. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, số 1, tr. 53.
3. Đỗ Trung Cứ, Trần Thị Hạnh, Nguyễn Quang Tuyên, Đỗ Thị Lan Phương (2003), “Xác định một số yếu tố gây bệnh của *Salmonella Typhimurium* phân lập từ lợn bị tiêu chảy ở một số tỉnh miền núi phía Bắc”. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, số 4, tr. 33-37.
4. Trần Thị Hạnh (2009), “Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. tại cơ sở giết mổ lợn công nghiệp và thủ công nghiệp”. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, số 2, tr. 51-56.
5. Nguyễn Bá Hiên (2001), *Một số vi khuẩn đường ruột thường gặp và biến động của chúng ở gia súc khỏe mạnh và bị tiêu chảy nuôi tại vùng ngoại thành Hà Nội*. Luận án Tiến sỹ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.
6. Hồ Văn Nam, Nguyễn Thị Đào Nguyên, Trương Quang, Phùng Quốc Chương, Chu Đức Thắng, Phạm Ngọc Thạch (1997), “Tình hình nhiễm *Salmonella* và vai trò của *Salmonella* trong bệnh viêm ruột ỉa chảy ở lợn”. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, số 2, tr. 39-45.
7. Cù Hữu Phú, Nguyễn Ngọc Nhiên, Vũ Bình Minh, Đỗ Ngọc Thuý (2000), “Phân lập vi khuẩn *E.coli* và *Salmonella* ở lợn mắc bệnh tiêu chảy, xác định một số đặc tính sinh vật hoá học của các chủng vi khuẩn phân lập được và biện pháp phòng trị”. *Kết quả nghiên cứu Khoa học kỹ thuật thú y (1996-2000)*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 171-176.
8. Lê Minh Sơn (2003), *Nghiên cứu một số vi khuẩn gây ô nhiễm thịt lợn vùng hữu ngạn sông Hồng*. Luận án Tiến sỹ Nông nghiệp.
9. Lê Văn Tạo, Nguyễn Thị Vui (1994), “Phân lập và định typ vi khuẩn *Salmonella* gây bệnh cho lợn”. *Tạp chí Nông nghiệp và công nghiệp thực phẩm*, số 11, tr. 430- 431
10. Asai T, Otagiri Y, Osumi T, Namimatsu T, Hirai H and Sato S (2002), “Isolation of *Salmonella* from Diarrheic Feces of Pig”. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 2, p. 159- 160.
11. Chiu C.H, Su L.H and Chu C (2004), “*Salmonella enterica* serotype *Choleraesuis*: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease and Treatment”. *Clinical Microbiology Reviews* 2, p. 311-322.