

MỘT SỐ YẾU TỐ ĐỘC LỰC CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ LỢN TẠI VIỆT NAM

Đặng Văn Tuấn¹, Lê Đình Hải¹, Nguyễn Bá Hiền², Võ Thành Thìn¹

TÓM TẮT

Từ 8 chủng *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) phân lập được trên mẫu bệnh phẩm lợn thu thập tại Việt Nam, chúng tôi tiến hành giám định gene mã hóa một số yếu tố độc lực bằng phương pháp PCR. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả 8 chủng *M. hyopneumoniae* phân lập đều mang 4 gene P36, P46, P65 và P97. Kiểm tra độc lực của các chủng vi khuẩn này trên lợn thí nghiệm cũng cho thấy cả 8 chủng đều có khả năng gây ra các triệu chứng và bệnh tích trên lợn ở các mức độ khác nhau. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở quan trọng để chọn lựa chủng làm giống sản xuất vắc-xin phòng bệnh viêm phổi địa phương do vi khuẩn *M. hyopneumoniae* gây ra ở lợn.

Từ khóa: lợn, *Mycoplasma hyopneumoniae*, yếu tố độc lực, PCR, Việt Nam

Some virulent elements of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains isolated from pigs in Viet Nam

Dang Van Tuan, Le Dinh Hai, Nguyen Ba Hien, Vo Thanh Thinh

SUMMARY

Detection of the genes encoding for some virulent elements of 8 *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) strains, which isolated from pigs raising in Viet Nam, was carried out by using PCR method. The studied result revealed that, all of 8 isolated strains carried P36, P46, P65 and P97 genes. Moreover, the result of testing virulence of these bacteria strains on the experimental pigs showed that all of the tested strains were able to cause the clinical signs and lung lesions with different levels in the experimental animals. These findings are important basis for selection of a candidate-strain that can be used as a master-seed for producing vaccine against *M. hyopneumoniae* infection in pigs.

Keywords: pigs, *Mycoplasma hyopneumoniae*, virulent factors, PCR, Viet Nam

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *M. hyopneumoniae* là tác nhân gây bệnh viêm phổi địa phương ở lợn (Enzootic porcine pneumonia). Bệnh xảy ra phổ biến, tỷ lệ mắc bệnh cao, gây thiệt hại kinh tế ở tất cả các nước chăn nuôi lợn trên thế giới. Bệnh làm giảm khả năng tăng trọng, giảm hiệu suất chuyển hóa thức ăn, tăng chi phí điều trị bệnh (Clark và cs., 1991). Nhiễm trùng *M. hyopneumoniae* không gây ra tỷ lệ chết cao, tuy nhiên nó làm tăng mức cảm của lợn đối với

các tác nhân gây bệnh khác như *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* và các loại virus như cúm lợn (swine influenza) hoặc virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS) (Sorensen và cs., 1997).

Ở nước ta, bệnh viêm phổi địa phương ở lợn đã được mô tả từ những năm 1950 (Nguyễn Ngọc Nhiên, 1997). Từ đó đến nay, đã có một số tác giả nghiên cứu về bệnh này (Trương Văn Dung và cs., 2002; Nguyễn Thị Phước Ninh và cs., 2008; Lê Văn Lành và cs., 2012). Tuy nhiên, do việc phân lập vi khuẩn *M. hyopneumoniae* rất khó khăn nên các nghiên cứu mới chỉ tập trung đánh giá về đặc điểm dịch tễ của bệnh.

¹ Phân viện thú y miền Trung

² Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Với việc phân lập thành công vi khuẩn *M. hyopneumoniae* trên mẫu bệnh phẩm lợn (Võ Thành Thìn và cs, 2016) cho phép chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm khảo sát các yếu tố độc lực của *M. hyopneumoniae* ở cấp độ DNA và gây nhiễm trên lợn thí nghiệm.

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

2.1. Nội dung

- Xác định một số gene quy định yếu tố độc lực của vi khuẩn *M. hyopneumoniae*.

- Độc lực của vi khuẩn *M. hyopneumoniae* phân lập được ở lợn.

2.2. Nguyên liệu

- Vi khuẩn *M. hyopneumoniae* phân lập từ mẫu bệnh phẩm lợn (Võ Thành Thìn và cs., 2016).

- Môi trường, hóa chất nuôi cấy vi khuẩn *M. hyopneumoniae*.

- Kit chiết tách DNA, môi, enzyme và hóa chất, sinh phẩm khác cho các phản ứng PCR.

- Kit ELISA IDEXX *M. hyo.* (Mỹ) kiểm tra

kháng thể kháng *M. hyopneumoniae*.

- DNA đối chứng dương được cung cấp bởi IZSve (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie) – Italia.

- Lợn con 3 - 4 tuần tuổi khỏe mạnh, không có kháng thể kháng *M. hyopneumoniae*.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp xác định yếu tố độc lực

Xác định một số yếu tố độc lực gồm P36, P46, P65 và P97 của các chủng *M. hyopneumoniae* phân lập được thông qua phát hiện các gene mã hóa kháng nguyên bằng phương pháp PCR. DNA của *M. hyopneumoniae* được chiết tách bằng bộ Kit Wizard Geneomic DNA Purification (Promega).

Primer phát hiện gene P97 và P46 được chọn lọc từ các tác giả Caron và cs (2000), Adams và cs (2005). Primer phát hiện gene P36 và P65 do chúng tôi tự thiết kế. Tất cả primer đều được kiểm tra tính đặc hiệu bằng phần mềm BLAST. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5% có bổ sung ethidium bromide. Trình tự nucleotide của các cặp primer được ghi ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự nucleotide của các cặp primer để xác định yếu tố độc lực của *M. hyopneumoniae*

Yếu tố độc lực	Trình tự mồi (5'→3')		Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Nguồn
P36	P36-F	GCGGGAAGACCACAAAAACC	423	Nghiên cứu này
	P36-R	TTCATAAGCCCGGCGAGAAA		
P46	P46-F	GCAGCAGGTTGTGGACAGAC	660	Caron và cs., 2000
	P46-R	CAGCATTTTCGCCTTCAGGAG		
P65	P65-F	GCACTAGGCGATTTCGCTAAC	503	Nghiên cứu này
	P65-R	TCTGCCAGGAAATTCGCTCTT		
P97	P97-F	GGAAATTATGCCTATGAATTCG	318	Adams và cs., 2005
	P97-R	GTGCTCTGTTAGTTTCTAGTCC		

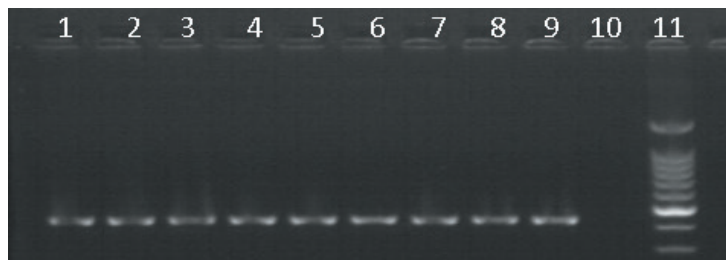
2.3.2. Phương pháp xác định độc lực *M. hyopneumoniae* trên lợn

Độc lực của các chủng *M. hyopneumoniae* phân lập được xác định theo phương pháp của

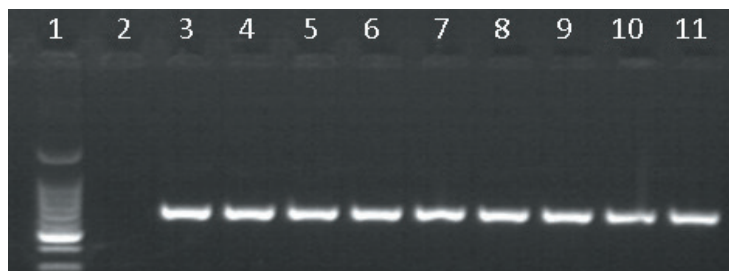
Vicca & cs (2003) và Villareal & cs (2012) gây nhiễm cho lợn cai sữa 3-4 tuần tuổi, không có kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* trong máu. Các chủng *M. hyopneumoniae* được nuôi

Bảng 2. Kết quả xác định gene mã hóa các yếu tố độc lực của *M. hyopneumoniae*

TT	Tên chủng	Yếu tố độc lực			
		P36	P46	P65	P97
1	PV3952	+	+	+	+
2	PV4490	+	+	+	+
3	PV1702	+	+	+	+
4	PV45	+	+	+	+
5	NT5F	+	+	+	+
6	M157	+	+	+	+
7	M183	+	+	+	+
8	M100	+	+	+	+

**Hình 2a. Sản phẩm PCR P36 (432bp)**

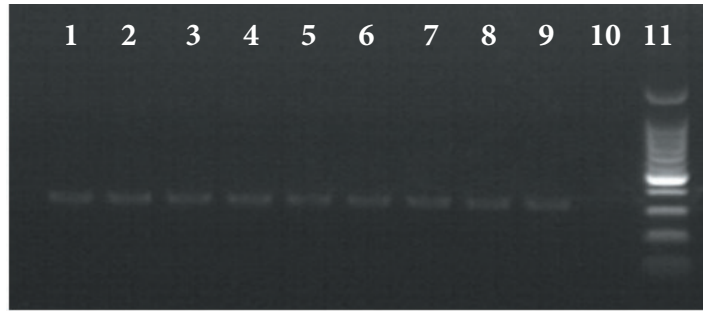
PV3952 (1); PV4490 (2); PV1702 (3); PV45 (4); NT5F (5); M157 (6); M183 (7); M100 (8); đối chứng dương (9); đối chứng âm (10); marker 100bp (11)

**Hình 2b. Sản phẩm PCR P46 (660bp)**

Marker 100bp (1); đối chứng âm (2); đối chứng dương (3); PV3952 (4); PV4490 (5); PV1702 (6); PV45 (7); NT5F (8); M157 (9); M183 (10); M100 (11)

**Hình 2c. Sản phẩm PCR P65 (503bp)**

Marker 100bp (1); đối chứng âm (2); đối chứng dương (3); PV3952 (4); PV4490 (5); PV1702 (6); PV45 (7); NT5F (8); M157 (9); M183 (10); M100 (11)



Hình 2d. P97 (318bp)

PV3952 (1); PV4490 (2); PV1702 (3); PV45 (4); NT5F (5); M157 (6); M183 (7); M100 (8); đối chứng dương (9); đối chứng âm (10); marker 100bp (11)

Vi khuẩn *M. hyopneumoniae* có khả năng tổng hợp một số protein quyết định tính kháng nguyên của nó, trong đó P36, P46, P65 và P97 là đáng chú ý nhất (Zhang và cs., 1995, Caron và cs., 2000). Sau khi xâm nhập vào cơ thể lợn qua đường hô hấp, vi khuẩn *M. hyopneumoniae* bám dính vào lớp lông rung trên đường hô hấp và xâm thực bề mặt lớp tế bào biểu mô lông rung trên khí quản, phế quản, tiểu phế quản (Kwon và cs., 2002). Quá trình bám dính này nhờ vào yếu tố độc lực là các carbohydrate và protein như P97 trên bề mặt tế bào vi khuẩn *M. hyopneumoniae* (Li và cs., 2009).

Kháng nguyên P97 là một protein màng, đóng vai trò quan trọng nhất trong cơ chế gây bệnh của *M. hyopneumoniae*, giúp vi khuẩn bám vào các tế bào lông nhung niêm mạc đường hô hấp của lợn để gây bệnh. Tính gây bệnh mang đặc trưng loài của *M. hyopneumoniae* là nhờ kháng nguyên P97. Kháng nguyên này chỉ bám dính đặc hiệu vào niêm mạc đường hô hấp của lợn mà không phải niêm mạc của các loài vật chủ khác (Hsu và cs., 1997).

Kháng nguyên P36 là một protein có trọng lượng phân tử 36 kDa được mã hóa bởi gene L-lactate dehydrogenase có kích thước 942 bp của vi khuẩn *M. hyopneumoniae*. Đây là một trong những protein có tính kháng nguyên cao, có khả năng gây đáp ứng miễn dịch nhanh và mạnh ở lợn nhiễm bệnh tự nhiên cũng như lợn gây nhiễm thực nghiệm. P36 là một kháng nguyên đặc trưng chỉ có ở duy nhất các loài *M. hyopneumoniae*, trong khi đó ở các loài *Mycoplasma* khác không có kháng nguyên này. Do đó kháng thể kháng protein P36 có thể được dùng để phát hiện các chủng *M.*

hyopneumoniae (Stipkovits và cs., 1991).

Kháng nguyên P46 được mã hóa bởi gene có kích thước 1260bp, trong khi đó kháng nguyên P65 được mã hóa bởi gene có kích thước 1803bp. Đây là hai protein bề mặt của *M. hyopneumoniae*. Những protein này có tính kháng nguyên cao, có khả năng gây đáp ứng miễn dịch sớm và đặc hiệu ở lợn con cai sữa và lợn trưởng thành khi nhiễm cấp tính hoặc ở giai đoạn đầu nhiễm *M. hyopneumoniae* (Hsu và cs., 1997).

Như vậy, việc phát hiện các gene quy định sinh tổng hợp 4 quyết định kháng nguyên chính (P36, P46, P65 và P97) ở cả 8 chủng *M. hyopneumoniae* là một trong những cơ sở để chọn lựa những chủng làm giống sản xuất vaccin phòng bệnh viêm phổi do *M. hyopneumoniae* gây ra ở lợn.

3.2. Kết quả xác định độc lực trên lợn

Độc lực của 8 chủng *M. hyopneumoniae* phân lập được xác định bằng cách gây nhiễm cho lợn cai sữa (28 ngày tuổi), không có kháng thể kháng *M. hyopneumoniae*. Mỗi chủng *M. hyopneumoniae* được gây nhiễm cho 2 lợn. Hàng ngày, theo dõi các biểu hiện lâm sàng trên lợn và chấm điểm: hắt hơi (0 điểm: không hắt hơi, 1 điểm: thỉnh thoảng có hắt hơi, 2 điểm: hắt hơi theo từng cơn, 3 điểm: hắt hơi dai dẳng, kéo dài); ho (0 điểm: không ho, 1 điểm: thỉnh thoảng có ho, ho từng tiếng, 2 điểm: ho nhiều theo từng cơn, 3 điểm: ho dai dẳng, kéo dài). Sau 28 ngày gây nhiễm, tiến hành mổ khám để đánh giá bệnh tích đại thể và lấy mẫu xét nghiệm vi thể. Điểm số được đánh giá riêng trên từng lợn thí nghiệm, sau đó tính giá trị trung bình.

Mẫu bệnh phẩm phổi của lợn thí nghiệm và đối chứng cũng được giám định sự có mặt của *M. hyopneumoniae*. Kết quả kiểm tra bằng phản ứng

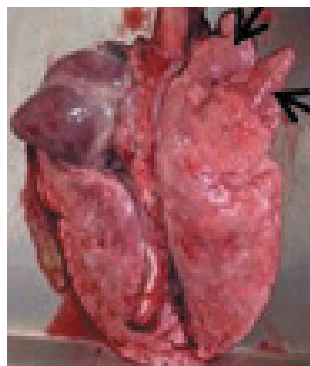
Realtime PCR cho thấy tất cả lợn gây nhiễm đều dương tính với *M. hyopneumoniae*, trong khi lợn đối chứng cho kết quả âm tính (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả đánh giá độc lực của các chủng *M. Hyopneumoniae* trên lợn

TT	Chủng <i>M. hyopneumoniae</i>	Biểu hiện lâm sàng		Bệnh tích đại thể (% thể tích phổi viêm)	Realtime PCR
		Hắt hơi	Ho		
1	PV3952	1,0 ± 0	1,33 ± 0,33	16,92 ± 1,04	+
2	PV4490	0,66 ± 0,33	1,0 ± 0	16,93 ± 1,68	+
3	PV1702	1,0 ± 0	0,66 ± 0,33	13,67 ± 0,92	+
4	PV45	0,66 ± 0,33	0,66 ± 0,33	7,92 ± 2,29	+
5	NT5F	0,33 ± 0,33	0,66 ± 0,33	9,0 ± 1,8	+
6	M157	0	0,33 ± 0,33	7,83 ± 0,82	+
7	M183	0,33 ± 0,33	0,66 ± 0,33	9,08 ± 1,92	+
8	M100	0,33 ± 0,33	0,33 ± 0,33	9,0 ± 0,72	+
9	Đối chứng	0	0	2,67 ± 0,58	-

Như vậy, cả 8 chủng *M. hyopneumoniae* phân lập đều có khả năng gây một số triệu chứng lâm sàng của bệnh viêm phổi ở lợn với các mức độ khác nhau. Trong đó, chủng PV3952, PV4490 và PV1702 gây bệnh tích viêm phổi nặng hơn, tỷ lệ phổi bị viêm cao hơn so với các chủng khác ($P \leq$

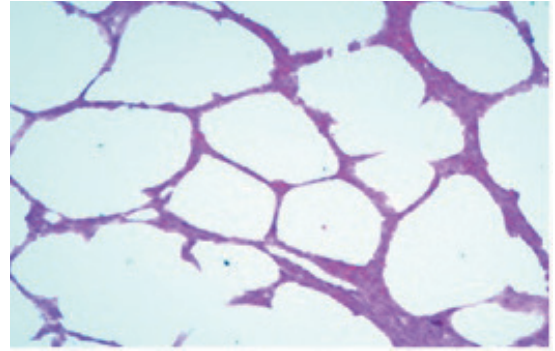
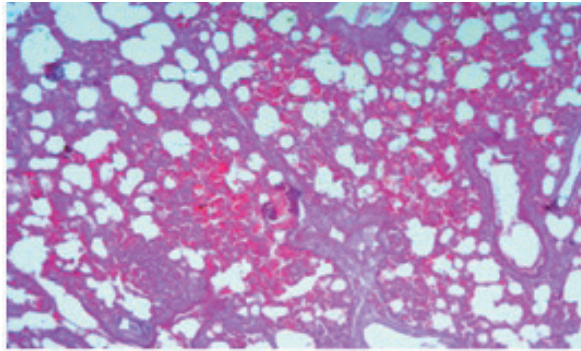
0,05). Ở nhóm đối chứng, lợn không thể hiện triệu chứng bệnh viêm phổi, lợn phát triển bình thường (hình 3a). Khi mổ khám, có lợn xuất hiện bệnh tích viêm phổi. Tuy nhiên, tỷ lệ phổi bị viêm rất thấp. So với nhóm lợn gây nhiễm, sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,05$).



Hình 3a. Ảnh bệnh tích đại thể trên phổi lợn thí nghiệm (phải) và phổi lợn đối chứng (trái)

Phân tích các bệnh tích vi thể cũng cho thấy trong khi phổi lợn đối chứng có phế nang mỏng, lòng phế nang rộng và trong sáng. Phổi lợn gây nhiễm bị sung huyết, mao quản ở vách phế nang dẫn rộng, chứa đầy hồng cầu bắt màu đỏ rõ, lòng phế nang bị thu hẹp. Viêm kẽ phổi, vùng vách

ngăn giữa các tiểu thùy phổi dẫn rộng do tăng sinh tế bào viêm. Vách phế quản nhẵn nhéo, lòng phế quản hẹp và có chứa hồng cầu (hình 3b). Kết quả này cho thấy các chủng *M. hyopneumoniae* phân lập được có độc lực trên lợn, đặc biệt là các chủng PV3952, PV4490 và PV1702.



Hình 3b. Ảnh bệnh tích vi thể trên phổi lợn thí nghiệm (trái) và phổi lợn đối chứng (phải) (HE 10X).

IV. KẾT LUẬN

- Tất cả các chủng *M. hyopneumoniae* phân lập được từ lợn đều mang các yếu tố độc lực P36, P46, P65 và P97.

- Các chủng *M. hyopneumoniae* phân lập được đều có độc lực đối với lợn thí nghiệm ở các mức độ khác nhau, gây ra tỷ lệ phổi viêm từ 9 đến 16,9%, trong đó các chủng PV3952, PV4490 và PV1702 có độc lực cao hơn các chủng còn lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Phước Ninh, Nguyễn Ngọc Tuấn, Trần Thị Dân, Nguyễn Thị Bạch Tuyết, 2008. Kháng thể mẹ truyền chống *Mycoplasma hyopneumoniae* và tăng trưởng ở heo con từ sơ sinh đến 60 ngày tuổi. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, 15(1): 26-32
2. Lê Văn Lân, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Trịnh Đình Thâu, Đặng Hữu Anh, Đỗ Ngọc Thúy, Nguyễn Bá Hiên, 2012. Một số đặc điểm dịch tễ học bệnh suyễn lợn và ứng dụng kỹ thuật semi-nested PCR xác định *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, XIX (2): 13-20.
3. Caron, J., Ouadani, M. & Dea, S. 2000. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J Clin Microbiol*, 38, 1390-6.
4. Clark, L., Armstrong, C., Freeman, M., Scheidt, A., Sands-Freeman, L. & Knox, K. 1991. Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumonia. *Veterinary medicine (USA)*.
5. Kleiboeker 2004. Development of Realtime, multiplex PCR/RT-PCR assays for improved PRDC pathogene detection. *University of Missouri-Columbia*.
6. Kwon, D., Choi, C. & Chae, C. 2002. Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. *Veterinary Pathology Online*, 39, 584-587.
7. Opriessnig, T., Thacker, E. L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X. J. & Halbur, P. G. 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol*, 41, 624-40.
8. Sorensen, V., Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, A. A., Feld, N. C., Friis, N. F., Bille-Hansen, V., Jensen, N. E. & Pedersen, M. W. 1997. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Veterinary Microbiology*, 54, 23-34.

Nhận ngày 30-11-2016

Phản biện ngày 16-3-2017