



KHOA HỌC KỸ THUẬT **Thú y**

JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE AND TECHNOLOGY

ISSN 1859 - 4751

Tập XXVI • Số 3 - 2019

HỘI THÚ Y VIỆT NAM
VIETNAM VETERINARY ASSOCIATION

KHOA HỌC KỸ THUẬT THÚ Y

JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE AND TECHNOLOGY

TẬP XXVI. SỐ 3 - 2019 VOL. XXVI. N°3 - 2019

HỘI THÚ Y VIỆT NAM
VIET NAM VETERINARY ASSOCIATION

KHOA HỌC KỸ THUẬT THÚ Y TẠP CHÍ RA 8 KỲ/NĂM CỦA HỘI THÚ Y VIỆT NAM

Tổng biên tập: GS.TS. Đậu Ngọc Hào

Phó TBT: PGS.TS. Trần Đình Từ, TS. Nguyễn Văn Cẩm

Thư ký tòa soạn: BS. Nguyễn Gia Tuệ

Hội đồng biên tập: PGS.TS. Đặng Xuân Bình, TS. Nguyễn Công Dân, TS. Nguyễn Tiến Dũng, TS. Trần Xuân Hạnh, PGS.TS. Phạm Khắc Hiếu, PGS.TS. Huỳnh Thị Mỹ Lệ, TS. Nguyễn Văn Hưng, PGS.TS. Nguyễn Việt Không, PGS.TS. Nguyễn Thị Lan, TS. Võ Thị Hải Lê, TS. Nguyễn Văn Long, PGS.TS. Nguyễn Hữu Nam, PGS.TS. Lê Văn Năm, PGS. TS. Phạm Hồng Ngân, PGS.TS. Võ Văn Nha, TS. Phan Thị Hồng Phúc, PGS.TS. Tô Long Thành, PGS.TS. Lê Quang Thông, TS. Nguyễn Tùng, GS.TS. Nguyễn Quang Tuyên

Địa chỉ giao dịch: TẠP CHÍ KHOA HỌC KỸ THUẬT THÚ Y

86 Trường Chinh - Đống Đa - Hà Nội

ĐT: 024 3629 0861 **Fax:** 024 3868 7731

Email: tckhktthuy@gmail.com

Website: www.hoithuyViet Nam.org.vn

Tài khoản: 1300 201 220282

Ngân hàng Nông nghiệp và PTNT - Chi nhánh Thăng Long

ISSN 1859 4751

MỤC LỤC

NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

- TRẦN THỊ THANH HÀ, TRƯƠNG ANH ĐỨC, LÝ ĐỨC VIỆT, VŨ THỊ HẢO, HOÀNG VĂN TUẤN, NGUYỄN THỊ CHINH, CHU THỊ NHƯ, NGUYỄN THẾ VINH, PHẠM THỊ NGỌC, ĐẶNG VŨ HOÀNG
Phân lập virus dịch tả lợn châu Phi trên môi trường tế bào Porcine Alveolar Macrophages (PAM) 5
- PHẠM MINH HẰNG, PHẠM THỊ THU THÚY, NGUYỄN VIỆT KHÔNG
Yếu tố nguy cơ liên quan đến huyết thanh dương tính virus PRRS mức hộ chăn nuôi ở tỉnh Phú Thọ và Quảng Ninh 12
- ĐÀO LÊ ANH, NGUYỄN THỊ LAN, NGUYỄN THỊ HẠNH, NGUYỄN THỊ THU HẰNG, NGUYỄN THỊ HOA, NGUYỄN THỊ NGỌC, LÊ VĂN HÙNG
Một số đặc điểm bệnh lý ở lợn con tiêu chảy do Rotavirus 21
- TẠ PHAN ANH, NGUYỄN VĂN DUY, VƯƠNG LAN ANH, TRẦN THỊ ĐỨC TÁM, NGUYỄN BÁ TIẾP
Ảnh hưởng của nồng độ muối cao và phương thức nuôi đến tỷ lệ phân lập, số lượng và tính miễn cảm kháng sinh của vi khuẩn *Escherichia coli* trên giống vịt biển 15 Đại Xuyên 31
- NGUYỄN THỊ ĐÁU, HỒ THỊ VIỆT THU
Đặc điểm di truyền của gen kháng kháng sinh ở vi khuẩn *Vibrio cholerae* phân lập tại tỉnh Trà Vinh 38
- CAM THỊ THU HÀ, PHẠM HỒNG NGÂN, TRƯƠNG LAN OANH, NGUYỄN THỊ TRANG
Khảo sát chất lượng sữa bò tươi tại xã Phù Đồng, huyện Gia Lâm, thành phố Hà Nội 47
- NGUYỄN NGỌC MINH TUẤN, BÙI KHÁNH LINH, NGUYỄN HOÀNG THỊNH, NGUYỄN THỊ THU HẰNG, TRẦN THỊ HẠNH, CHU ĐÌNH TỐI, MAI VŨ THANH
Xác định một số gen gây bệnh của vi khuẩn chịu nhiệt *Campylobacter* spp. phân lập từ thịt lợn và thịt gà tại Việt Nam 54
- NGUYỄN VĂN TUYÊN
Đánh giá mức độ ô nhiễm vi khuẩn chỉ điểm vệ sinh thực phẩm, đặc điểm sinh học của vi khuẩn *E. coli* trong thịt lợn tại tỉnh Điện Biên 61

NÂNG CAO - THAM KHẢO

- NGUYỄN ĐĂNG THỌ
Các phương pháp chẩn đoán dịch tả lợn châu Phi, chẩn đoán phân biệt với dịch tả lợn cổ điển và một số bệnh đỏ khác 71

TRAO ĐỔI KHKT - HOẠT ĐỘNG NGÀNH

- FERNANDO RODRÍGUEZ
Khi nào chúng ta có vaccin phòng bệnh dịch tả lợn châu Phi - ASF 89
- ĐẬU NGỌC HẢO (dịch)
Cập nhật tình hình dịch tả lợn châu Phi tại Trung Quốc 91
- TRẦN XUÂN HẠNH, NGUYỄN QUANG HUY
Interferon type I và bệnh dịch tả heo châu Phi 94
- HOÀNG KHÁNH HƯNG
Từ nguyên tắc phòng chống dịch bệnh truyền nhiễm đến phương pháp phòng chống dịch bệnh dịch tả lợn châu Phi và định hướng công tác phòng chống dịch bệnh trong thời gian tới 96
- CEVA VIỆT NAM
Coglapest và dịch vụ kỹ thuật đánh giá miễn dịch bảo hộ dịch tả heo cổ điển (CSF) 99

CONTENTS

SCIENTIFIC RESEARCH

- TRAN THI THANH HA, TRUONG ANH DUC, LY DUC VIET, VU THI HAO, HOANG VAN TUAN, NGUYEN THI CHINH, CHU THI NHU, NGUYEN THE VINH, PHAM THI NGOC, DANG VU HOANG
Isolation of African swine fever virus on Porcine alveolar macrophages (PAM) cells 5
- PHAM MINH HANG, PHAM THI THU THUY, NGUYEN VIET KHONG
Risk factors associated with seropositivity to PRRS virus at household farm level in Phu Tho and Quang Ninh provinces 12
- DAO LE ANH, NGUYEN THI LAN, NGUYEN THI HANH, NGUYEN THI THU HANG, NGUYEN THI HOA, NGUYEN THI NGOC, LE VAN HUNG
Some pathological characteristics of the piglets suffering with diarrhea caused by Rotavirus 21
- TA PHAN ANH, NGUYEN VAN DUY, VUONG LAN ANH, TRAN THI DUC TAM, NGUYEN BA TIEP
Effects of high salinity concentration and raising conditions to isolation rate, bacterial count and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* in sea duck 15 Dai Xuyen breed 31
- NGUYEN THI DAU, HO THI VIET THU
Genetic characteristics of antibiotic resistance genes in *Vibrio cholerae* isolated in Tra Vinh province 38
- CAM THI THU HA, PHAM HONG NGAN, TRUONG LAN OANH, NGUYEN THI TRANG
Evaluation on quality of raw fresh milk in Phu Dong commune, Gia Lam district, Ha Noi city 47
- NGUYEN NGOC MINH TUAN, BUI KHANH LINH, NGUYEN HOANG THINH, NGUYEN THI THU HANG, TRAN THI HANH, CHU DINH TOI, MAI VU THANH
Determining some pathogenic genes of heating resistant *Campylobacter* spp. isolated from chicken meat and pork in Viet Nam 54
- NGUYEN VAN TUYEN
Survey on microbial contamination, characteristics of *E. coli* bacteria in pork samples collected in Dien Bien province 61

FOLLOWING - UP FORMATION

- NGUYEN DANG THO
Diagnostic methodologies for African Swine Fever, differencing diagnosis with Classical Swine Fever and other swine diseases 71

SCIENTIFIC AND TECHNICAL EXCHANGE - PROFESSIONAL ACTIVITIES

- FERNANDO RODRÍGUEZ
When do we have vaccine against ASF 89
- DAU NGOC HAO (Translator)
Update of African Swine Fever situation in China 91
- TRAN XUAN HANH, NGUYEN QUANG HUY
Interferon type I and African Swine Fever 94
- HOANG KHANH HUNG
The measures of infectious disease prevention applying for African Swine Fever prevention and orientation of epidemic prevention in the coming time 96
- CEVA Viet Nam
Coglapest and technical service evaluation on Classical Swine Fever protection immune 99

Nghiên cứu khoa học

PHÂN LẬP VIRUS DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI TRÊN MÔI TRƯỜNG TẾ BÀO PORCINE ALVEOLAR MACROPHAGES (PAM)

*Trần Thị Thanh Hà¹, Trương Anh Đức¹, Lý Đức Việt¹,
Vũ Thị Hảo¹, Hoàng Văn Tuấn¹, Nguyễn Thị Chinh¹,
Chu Thị Như¹, Nguyễn Thế Vinh², Phạm Thị Ngọc³, Đặng Vũ Hoàng¹*

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, môi trường tế bào Porcine Alveolar Macrophages (PAM) bước đầu đã được ứng dụng để nuôi cấy, phân lập virus dịch tả lợn châu Phi (DTLCP) từ mẫu bệnh phẩm thu ở thực địa. Lợn nghi mắc bệnh DTLCP có các triệu chứng và bệnh tích điển hình được sử dụng để làm vật liệu nghiên cứu. Virus DTLCP được phát hiện bằng phương pháp PCR truyền thống kết hợp giải trình tự gen sử dụng cặp mồi đặc hiệu PPA1 và PPA2. Kết quả nghiên cứu cho thấy mẫu bệnh phẩm cho kết quả PCR dương tính với virus DTLCP và chủng DTLCP có trình tự gen tương đồng 100% so với các chủng tương ứng tham chiếu đã công bố trước đây. Virus DTLCP sau đó đã được phân lập trên tế bào PAM và được giám định lại bằng 2 phương pháp: phương pháp hấp phụ hồng cầu (HAD test) và phương pháp PCR, theo khuyến cáo của OIE/FAO. Các kết quả nghiên cứu thu được cho thấy, chủng virus phân lập được dương tính với cả hai phương pháp HAD test và PCR. Thành công của nghiên cứu này là đã phân lập được chủng virus DTLCP từ mẫu bệnh phẩm thực địa.

Từ khóa: Dịch tả lợn châu Phi, ASFV, phân lập virus, hấp phụ hồng cầu.

Isolation of African swine fever virus on Porcine alveolar macrophages (PAM) cells

*Tran Thi Thanh Ha, Truong Anh Duc, Ly Duc Viet,
Vu Thi Hao, Hoang Van Tuan, Nguyen Thi Chinh,
Chu Thi Nhu, Nguyen The Vinh, Pham Thi Ngoc, Dang Vu Hoang*

SUMMARY

In this study, the porcine alveolar macrophages (PAM) cell medium was used for culturing and isolating the African swine fever virus (ASFV) from the field samples. The ASFV suspected pigs with the typical clinical signs and pathological lesions, was used as the studied material. The ASFV was detected by conventional PCR technique in combination with sequence analysis using specific primers, PPA1 and PPA2. As a result, the samples were positive with ASFV by PCR and ASFV strain presented 100% of the nucleotide sequence similarity level in comparison with those of the previous isolation ASFV. Furthermore, the isolation of ASFV was conducted using PAM cell system and this isolate was further confirmed by haemadsorption (HAD) test and PCR technique according to the recommendation of OIE/FAO. The studied result showed that the isolated virus strain was positive in both HAD test and PCR technique. It is concluded that ASFV was successfully isolated on PAM cells from the field samples in Viet Nam.

Keywords: ASFV, PAM cell, isolate, HAD.

¹. Bộ môn Hóa sinh miễn dịch - Viện Thú y

². Bộ môn Virus - Viện Thú y

³. Phòng Thí nghiệm tổng hợp và bảo tồn quỹ gen - Viện Thú y

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dịch tả lợn châu Phi (DTLCP) là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, virus chỉ gây bệnh cho lợn nuôi và lợn rừng; không gây bệnh cho người và các loài động vật khác. Lợn bệnh có khả năng chết lên đến 100% và có tác động lớn đến kinh tế các nước phát triển và đang phát triển [3, 4]. Bệnh DTLCP có khả năng lây lan nhanh, gây thiệt hại lớn cho ngành chăn nuôi lợn. Virus có sức đề kháng cao, tồn tại lâu ở ngoài môi trường và trong các sản phẩm của lợn; bệnh lây lan trực tiếp từ lợn bệnh sang lợn chưa mắc bệnh, sản phẩm lợn mang mầm bệnh hoặc gián tiếp qua các loài vật chủ trung gian mang mầm bệnh (ve, mòng, côn trùng, gặm nhấm, chim di cư...) [14], các phương tiện vận chuyển, thức ăn chăn nuôi, dụng cụ chăn nuôi và cả yếu tố con người [2, 3, 12, 14]. Hiện nay trên thế giới chưa có vaccin phòng bệnh, và cũng chưa có thuốc điều trị bệnh. Tác nhân gây bệnh là virus DTLCP, đây là một loại ADN virus, thuộc họ *Asfarviridae* [3, 4]. Bệnh do virus DTLCP lần đầu tiên được ghi nhận đã xảy ra vào năm 1907, tuy nhiên ca bệnh DTLCP được mô tả lần đầu tiên vào năm 1921 tại Kenya và sau đó bệnh lan rộng ra các nước châu Âu, Nam Mỹ và vùng Caribbean vào giữa thế kỷ trước [3]. Tại châu Á, bệnh DTLCP lần đầu tiên được phát hiện tại Trung Quốc vào đầu tháng 8/2018 [13] và sau đó là tại Mông Cổ vào đầu tháng 1/2019 (OIE/FAO). Tại Việt Nam, từ ngày 1/2 - 20/3/2019, bệnh DTLCP xảy ra tại 310 xã, 62 huyện của 20 tỉnh, thành phố (Hưng Yên, Thái Bình, Hải Phòng, Thanh Hóa, Hà Nội, Hải Dương, Hà Nam, Hòa Bình, Điện Biên, Thái Nguyên, Quảng Ninh, Ninh Bình, Nam Định, Lạng Sơn, Bắc Kạn, Sơn La, Nghệ An, Bắc Ninh, Thừa Thiên Huế và Lai Châu); tổng số lợn bị mắc bệnh và tiêu hủy là hơn 37 nghìn con (Cục Thú y). Theo thông tin từ OIE [7], tính từ năm 2017 đến ngày 19/3/2019, đã có hơn 20 quốc gia báo cáo có bệnh DTLCP. Cho đến nay, chủng virus DTLCP đã xác định được tổng cộng 24 genotype [13].

Hiện nay theo khuyến cáo của OIE, các phương pháp sinh học phân tử dùng trong chẩn đoán bệnh DTLCP như PCR, Realtime PCR, ELISA, phản ứng miễn dịch huỳnh quang (IFT hoặc DIFT), mỗi phương pháp đều có ưu điểm và nhược điểm riêng [7, 8]. Phương pháp Realtime PCR là phương pháp

nhạy, độ đặc hiệu cao. Đây là phương pháp đang được sử dụng rộng rãi tại Việt Nam để chẩn đoán DTLCP. Tuy nhiên đây không phải là phương pháp hoàn hảo. Những nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng, nếu có sự sai khác giữa trình tự mỗi đặc hiệu và mẫu dò (probe) với trình tự gen chủng thực địa, có thể gây ra kết quả Realtime PCR âm tính giả. Khả năng gây âm tính giả của phương pháp Realtime PCR trong chẩn đoán phát hiện virus thực địa có thể lên tới 60% [5, 11]. Các phương pháp nghiên cứu chẩn đoán virus học được OIE/FAO khuyến cáo sử dụng để xác định virus DTLCP là phương pháp phân lập virus DTLCP trên tế bào đại thực bào (PAM) kết hợp với phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD) [7]. Phương pháp phân lập virus trên tế bào PAM kết hợp với phản ứng HAD là "phương pháp vàng" thường được dùng để khẳng định lại các kết quả dương tính của các phương pháp sinh học phân tử khác dùng trong chẩn đoán như PCR, Realtime PCR hay ELISA [1, 7-9]. Hiện nay, tại Việt Nam chưa có phòng thí nghiệm nào thực hiện thành công việc phân lập virus trên tế bào PAM kết hợp với phản ứng HAD trong nghiên cứu virus DTLCP. Để phục vụ công tác chẩn đoán bệnh DTLCP nhằm khống chế và kiểm soát bệnh, chúng tôi tiến hành nghiên cứu phân lập virus DTLCP sử dụng tế bào macrophages từ phổi lợn (PAM).

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm là hạch màng treo ruột, lách và thận lợn nghi nhiễm virus DTLCP được thu thập theo tiêu chuẩn của OIE [7]. Bệnh phẩm được nghiền trong cối chày sứ, tạo huyền dịch 10% trong MEM 1X có bổ sung kháng sinh như thường quy, bảo quản ở -70°C cho đến khi xét nghiệm.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Phương pháp PCR truyền thống sử dụng cặp mồi PPA1/PPA2 xác định sự có mặt của virus DTLCP từ mẫu bệnh phẩm thu thập tại thực địa theo hướng dẫn của OIE [7].

- Thiết lập hệ thống nuôi cấy tế bào Porcine alveolar macrophages (PAM) dùng trong phân lập virus DTLCP từ thực địa và phản ứng hấp phụ hồng

cầu (HAD) dùng trong giám định virus DTLCP theo khuyến cáo của FAO và OIE [7].

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp PCR truyền thống phát hiện DNA virus DTLCP

Mẫu DNA được tách từ huyền dịch bệnh phẩm 10% trong MEM 1X sử dụng kit PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất; thu DNA trong 50µl nước (nuclease free water).

PCR nhân gen sử dụng bộ kit GoTaq Green 2X Master Mix (Promega, Hoa Kỳ) với cặp mồi đặc hiệu theo hướng dẫn của OIE cho virus DTLCP, PPA1 và PPA2 cho sản phẩm PCR 257 bp.

ASFV-PPA1

5'-AGTTATGGGAAACCCGACCC-3'

ASFV-PPA2

5'-CCCCTGAATCGGAGCATCCT-3'

Chu trình nhiệt bao gồm 94°C trong 10 phút; 40 chu kỳ của 94°C trong 15 giây, 62°C trong 30 giây và 72°C trong 30 giây; và sau cùng 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên agarose 2% và hiển thị dưới đèn UV.

- Phương pháp giải trình tự gen sử dụng cặp mồi PPA1/PPA2

Sản phẩm PCR khoảng 257bp được điện di và tinh khiết bằng kit (Qiagen, QIAEX II, Gel Extraction Kit, Đức). Giải trình tự được thực hiện theo hướng dẫn của nhà cung cấp kit Bigdye terminator V3.1 (ABI, Hoa Kỳ), điện di và đọc trình tự nucleotide tự động trên máy sequencer ABI 3100 (Hoa Kỳ) được thực hiện tại Công ty Gentis (Tây Hồ, Hà Nội).

Phân tích trình tự dựa vào sự hỗ trợ của phần mềm chuyên dụng: So sánh trình tự bằng phần mềm Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), so sánh đa chuỗi sử dụng ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) và DNASTAR Lasergene (DNASTAR, Inc., Hoa Kỳ).

- Phương pháp nuôi cấy tế bào PAM dùng trong phân lập virus DTLCP từ thực địa và phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD) dùng trong giám định virus DTLCP theo khuyến cáo của FAO và OIE.

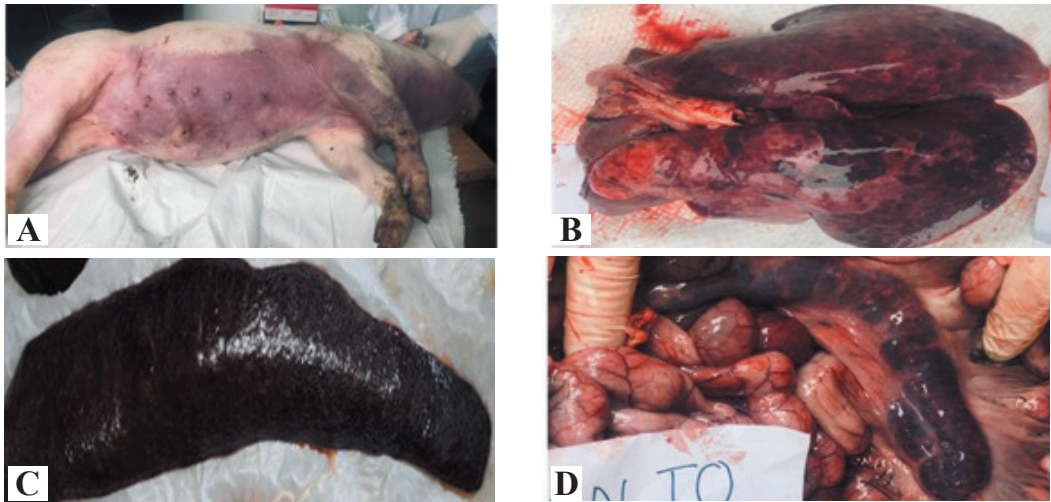
Đại thực bào phẩy nang của lợn (PAM) sử dụng để phân lập virus DTLCP được lấy từ phổi lợn sạch âm tính với virus DTLCP, dịch tả lợn cổ điển, PCV2 và PRRS như đã mô tả trước đây [1] và theo khuyến nghị của OIE [7]. Tế bào được thu và hoàn nguyên trong môi trường Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher, Hoa Kỳ) được bổ sung streptomycin (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ), ampicillin (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) và huyết thanh bào thai bê 5% (FCS, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) với nồng độ tế bào cuối cùng là: 1×10^6 tế bào/ml. Virus DTLCP được phân lập trên đĩa nuôi cấy tế bào 6 giếng/đĩa (Thermo Fisher, Hoa Kỳ), mỗi giếng chứa 2 ml huyền dịch tế bào và 50µl huyền dịch 10% bệnh phẩm. Đĩa phân lập được nuôi cấy trong 3 ngày ở 37°C, 5% CO₂, virus DTLCP thu hoạch bằng cách đóng băng và giải đông tan. Sau đó được tiếp đời lần 2, sử dụng 50 µl huyền dịch tế bào-virus phân lập lần 1 được nuôi cấy trong 2ml môi trường tế bào PAM (1×10^6 tế bào/ml), sau đó được nuôi cấy và thu hoạch như mô tả cho lần phân lập đầu tiên. Virus DTLCP tiếp đời lần 3, sử dụng 50µl huyền dịch tế bào-virus phân lập lần 2 được nuôi cấy trong 2ml môi trường tế bào PAM (1×10^6 tế bào/ml) ở 37°C, 5% CO₂. Sau 24 giờ nuôi cấy, bổ sung vào giếng tiếp đời virus 20µl 1% hồng cầu lợn (RBC) để kiểm tra khả năng hấp phụ hồng cầu (HAD) của các tế bào PAM nhiễm virus DTLCP sau 5-6 ngày gây nhiễm theo hướng dẫn của OIE [7].

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Triệu chứng và bệnh tích lợn nghi nhiễm bệnh DTLCP

Việc xác định các triệu chứng lâm sàng và các tổn thương bệnh lý là bước quan trọng để chẩn đoán bệnh DTLCP. Như thể hiện trong hình 1, lợn nghi mắc bệnh DTLCP được thu thập và đánh giá các triệu chứng lâm sàng điển hình như sốt cao và xuất huyết ở da vùng chân và bụng. Ngoài ra, bệnh tích điển hình là các hạch bạch huyết bị xuất huyết và lách sưng to, sẫm màu và xuất huyết, gần như có màu đen (hình 1).

Theo OIE, các nốt xuất huyết thường xuyên xuất hiện trên cơ thể, hạch bạch huyết, lách, phổi, tim, gan, thận và bàng quang. Trong trường hợp mạn tính, có thể có viêm khớp, viêm màng



Hình 1. Bệnh tích lợn nghi nhiễm virus DTLCP

A: Các nốt xuất huyết xanh, tím trên da; B: Phổi sung huyết; C: Lách sưng to, đen và xuất huyết; D: Hạch màng treo ruột sưng to, xuất huyết

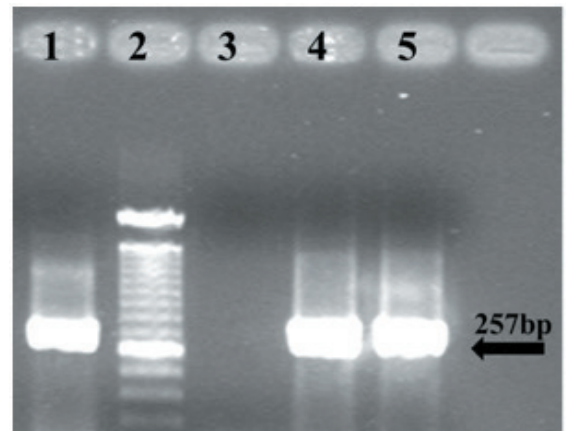
phổi, viêm phổi và loét da. Với những dấu hiệu lâm sàng và triệu chứng bệnh tích điển hình này cho thấy khả năng lợn bị nhiễm virus DTLCP là rất cao [7].

3.2. Phản ứng PCR truyền thống và giải trình tự gen xác định sự có mặt của virus DTLCP

Để xác định sự có mặt của virus DTLCP trong mẫu bệnh phẩm, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR truyền thống theo hướng dẫn của OIE, sử dụng cặp mồi đặc hiệu là PPA1, PPA2. Kết quả PCR với sản phẩm nhân gen đặc hiệu được mô tả ở hình 2.

Ở hình 2, đối chứng dương là mẫu DNA chuẩn do TS. Takehiro Kokuho (Viện Thú y Nhật Bản) cung cấp, đối chứng âm là mẫu hạch lâm ba từ lợn không nhiễm virus DTLCP hồi cứu từ nghiên cứu trước đây có nguồn gốc từ Nghệ An (2015). Đối với 2 mẫu xét nghiệm gồm hạch màng treo ruột và lách của lợn nghi mắc bệnh DTLCP, sản phẩm PCR cho vạch hơn 250 bp (257 bp theo thiết kế của mồi đặc hiệu), chứng tỏ mẫu xét nghiệm có chứa DNA của virus DTLCP.

Để xác định chính xác mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm virus DTLCP, chúng tôi tiến hành giải trình tự đoạn gen p72 sử dụng cặp mồi đặc hiệu



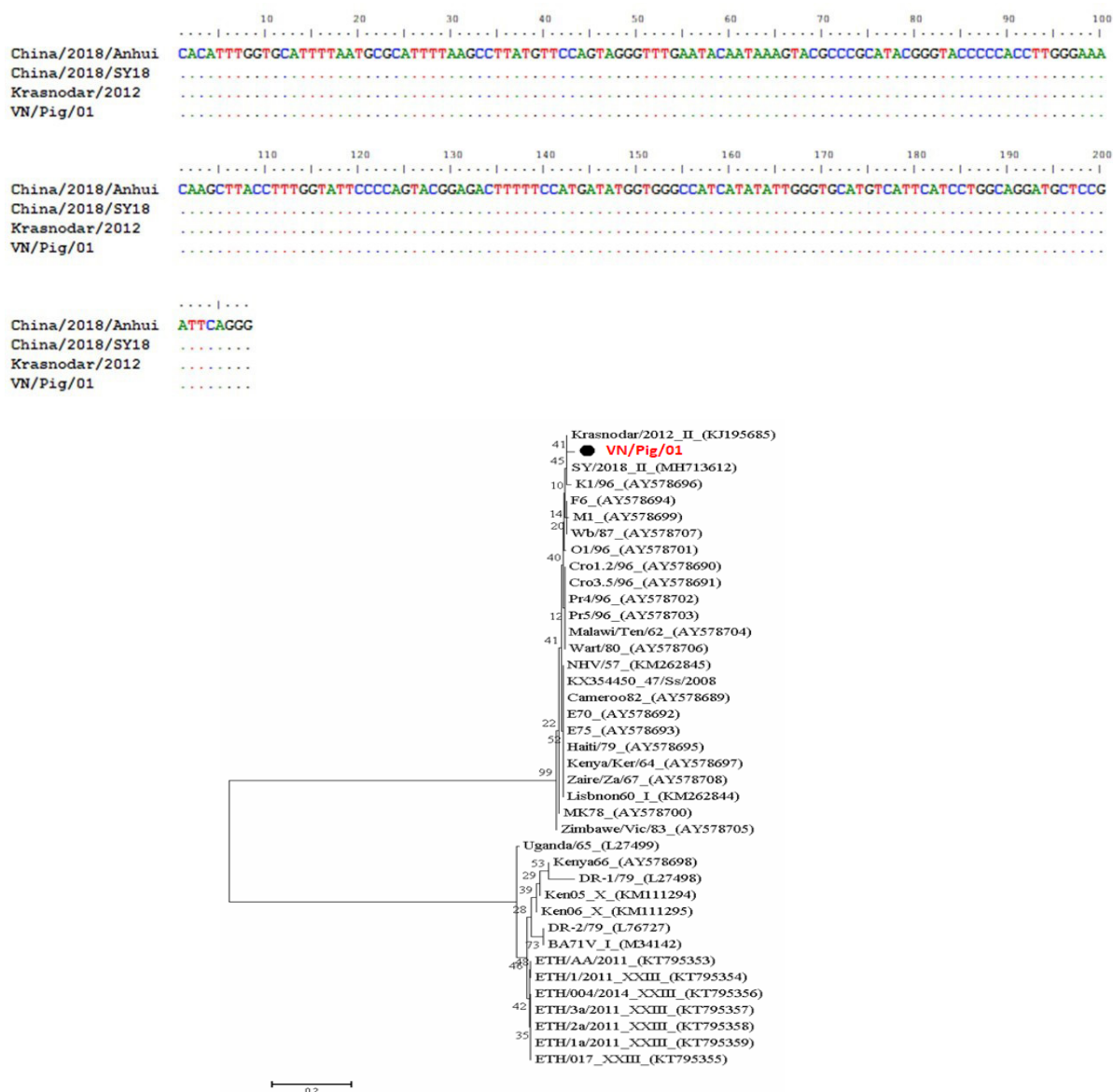
Hình 2. Kết quả phản ứng PCR truyền thống chẩn đoán mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm virus DTLCP với cặp mồi PPA1/PPA2

Giếng 1: DNA marker 50bp DNA ladder; Giếng 2: đối chứng dương DTLCP DNA chuẩn; Giếng 3: đối chứng âm tính (hạch lâm ba lợn không nhiễm DTLCP); Giếng 4-5 hạch màng treo ruột và lách lợn nghi nhiễm DTLCP

là PPA1 và PPA2. Kết quả giải trình tự gen virus DTLCP sử dụng cặp mồi đặc hiệu PPA1 và PPA2 được thể hiện qua hình 3. Qua phân tích trình tự nucleotide của virus DTLCP thu

thập từ thực địa cho thấy, trình tự nucleotide của các virus DTLCP ở Việt Nam có độ tương đồng rất cao (100%) với chủng virus DTLCP công bố lần đầu tiên tại Trung Quốc (ASFV-SY18) [13] và chủng Krasnodar 2012 của Nga phân lập năm 2012 [6]. Từ kết quả PCR và giải

trình tự gen, chúng tôi bước đầu kết luận mẫu bệnh phẩm lợn nhiễm virus DTLCP. Để xác định chắc chắn hơn, chúng tôi tiếp tục sử dụng phương pháp phân lập virus trên môi trường tế bào đại thực bào (PAM) theo khuyến cáo của OIE/FAO.

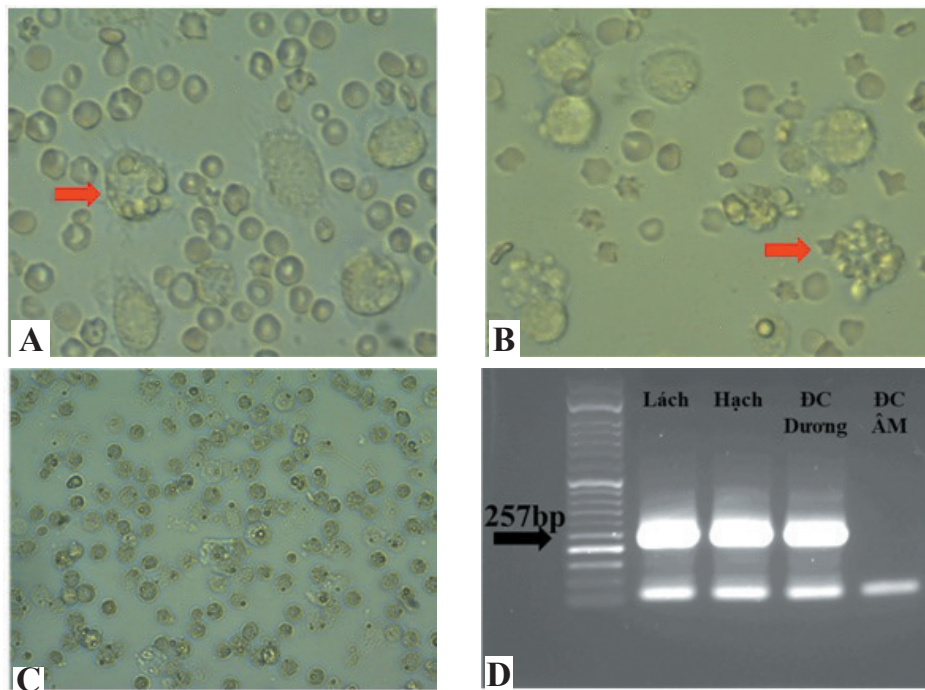


Hình 3. A. So sánh trình tự gen virus DTLCP từ mẫu bệnh phẩm sử dụng cặp mồi PPA1/PPA2 với các chủng tham chiếu China/2018/Anhui (MK128995), ASFV-SY18/II/China (MH713612) và Nga/Krasnodar/2012 (KJ195685). B. Cây phả hệ trình tự đoạn gen p72 được khuếch đại bởi cặp mồi PPA1 và PPA2

3.3. Phân lập virus DTLCP và phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD)

Phương pháp phân lập virus trên môi trường tế bào PAM và phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD) là phương pháp vàng để xác định chính xác lợn có nhiễm virus DTLCP hay không. Đây là phương

pháp cuối cùng được OIE/FAO khuyến cáo thực hiện để làm tham chiếu cho các kết quả dương tính với các phương pháp khác như: Ag-Elisa, PCR truyền thống, Realtime PCR, hoặc nhuộm hóa miễn dịch đã dùng trước đó, đặc biệt áp dụng phương pháp này trong trường hợp ổ dịch hay ca bệnh DTLCP đầu tiên.



Hình 4. A và B: Kết quả phân lập virus DTLCP trên môi trường tế bào PAM kết hợp phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD): Có nhiều tế bào hồng cầu bám vào trên bề mặt tế bào PAM bị nhiễm virus DTLCP (mũi tên); C: Đối chứng âm (môi trường tế bào PAM); D: Phản ứng PCR khẳng định phát hiện virus DTLCP phân lập trên tế bào PAM với cặp mồi PPA1/PPA2

Kết quả phân lập virus DTLCP kết hợp với phản ứng HAD từ mẫu bệnh phẩm thực địa được thể hiện trên hình 4 cho thấy, các tế bào PAM nhiễm virus DTLCP trên bề mặt có nhiều tế bào hồng cầu bám vào sau 5 ngày gây nhiễm. Đây là bệnh tích điển hình của virus DTLCP khi phân lập trên tế bào PAM kết hợp phản ứng HAD theo hướng dẫn của OIE và FAO. Những giống có kết quả HAD dương tính, chúng tôi tiến hành tách chiết DNA virus, và thực hiện kiểm tra bằng phản ứng PCR truyền thống theo quy trình được khuyến cáo bởi OIE/FAO. Kết quả kiểm tra mẫu phân lập bằng phương pháp PCR

truyền thống được thể hiện qua hình 4 cho thấy: Các mẫu phân lập đều cho kết quả PCR dương tính với virus DTLCP. Từ những kết quả thu được, chúng tôi đi đến kết luận, mẫu bệnh phẩm hạch, lách thu thập từ lợn tại thực địa dương tính với virus DTLCP và đây là lần đầu tiên tại Việt Nam thiết lập được hệ thống phân lập virus DTLCP sử dụng tế bào PAM kết hợp phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD).

IV. KẾT LUẬN

Từ những kết quả trên chúng tôi có một số kết luận sau:

- Phương pháp PCR truyền thống kết hợp giải trình tự gen là phương pháp có độ chính xác cao và phù hợp trong điều kiện Việt Nam để phát hiện sự có mặt của virus DTLCP trong mẫu bệnh phẩm thực địa

- Đã ứng dụng thành công hệ thống nuôi cấy tế bào đại thực bào (PAM) và phản ứng hấp phụ hồng cầu (HAD) dùng trong phân lập và chẩn đoán khẳng định sự có mặt của virus DTLCP từ mẫu bệnh phẩm, đặc biệt đối với ổ dịch DTLCP nguyên phát hay ca bệnh DTLCP đầu tiên.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn TS. Takehiro Kokuho và TS. Kohtaro Miyazawa, Viện Thú y Nhật Bản đã hỗ trợ trong việc thiết lập hệ thống nuôi cấy tế bào PAM tại Viện Thú y.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Carrascosa AL, Bustos MJ, and de Leon P. Methods for growing and titrating African swine fever virus: field and laboratory samples. Curr Protoc Cell Biol 2011, Chapter 26, Unit 26 14.
2. Cubillos C, Gomez-Sebastian S, Moreno N, Nunez MC, Mulumba-Mfumu LK, Quembo CJ, Heath L, Etter EM, Jori F, Escribano JM, and Blanco E. African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples. Virus Res 2013, 173, 159-167.
3. Galindo I, and Alonso C. African Swine Fever Virus: A Review. Viruses 2017, 9.
4. Gallardo C, Nieto R, Soler A, Pelayo V, Fernandez-Pinero J, Markowska-Daniel I, Pridotkas G, Nurmoja I, Granta R, Simon A, Perez C, Martin E, Fernandez-Pacheco P, and Arias M. Assessment of African Swine Fever Diagnostic Techniques as a Response to the Epidemic Outbreaks in Eastern European Union Countries: How To Improve Surveillance and Control Programs. J Clin Microbiol 2015, 53, 2555-2565.
5. Kamau E, Agoti CN, Lewa CS, Oketch J, Owor BE, Otieno GP, Bett A, Cane PA, and Nokes DJ. Recent sequence variation in probe binding site affected detection of respiratory syncytial virus group B by Realtime RT-PCR. J Clin Virol 2017, 88, 21-25.
6. Kolbasov D, Titov I, Tsybanov S, Gogin A, and Malogolovkin A. African Swine Fever Virus, Siberia, Russia, 2017. Emerg Infect Dis 2018, 24, 796-798.
7. OIE. African swine fever. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012, Chapter 281 2012.
8. Oura CA, Edwards L, and Batten CA. Virological diagnosis of African swine fever-comparative study of available tests. Virus Res 2013, 173, 150-158.
9. Quembo CJ, Jori F, Vosloo W, and Heath L. Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype. Transbound Emerg Dis 2018, 65, 420-431.
10. Simulundu E, Sinkala Y, Chambaro HM, Chinyemba A, Banda F, Mooya LE, Ndebe J, Chitanga S, Makungu C, Munthali G, Fandamu P, Takada A, and Mweene AS. Genetic characterisation of African swine fever virus from 2017 outbreaks in Zambia: Identification of p72 genotype II variants in domestic pigs. Onderstepoort J Vet Res 2018, 85, e1-e5.
11. Suss B, Flekna G, Wagner M, and Hein I. Studying the effect of single mismatches in primer and probe binding regions on amplification curves and quantification in Realtime PCR. J Microbiol Methods 2009, 76, 316-319.
12. van Heerden J, Malan K, Gadaga BM, and Spargo RM. Reemergence of African Swine Fever in Zimbabwe, 2015. Emerg Infect Dis 2017, 23, 860-861.
13. Zhou X, Li N, Luo Y, Liu Y, Miao F, Chen T, Zhang S, Cao P, Li X, Tian K, Qiu HJ, and Hu R. Emergence of African Swine Fever in China, 2018. Transbound Emerg Dis 2018.
14. Zsak L, Borca MV, Risatti GR, Zsak A, French RA, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Callahan JD, Nelson WM, and Rock DL. Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a Realtime PCR assay. J Clin Microbiol 2005, 43, 112-119.

Ngày nhận 14-2-2019

Ngày phản biện 3-4-2019

Ngày đăng 1-5-2019

YẾU TỐ NGUY CƠ LIÊN QUAN ĐẾN HUYẾT THANH DƯƠNG TÍNH VIRUS PRRS MỨC HỘ CHĂN NUÔI Ở TỈNH PHÚ THỌ VÀ QUẢNG NINH

*Phạm Minh Hằng, Phạm Thị Thu Thủy, Nguyễn Việt Không
Viện Thú y*

TÓM TẮT

Một nghiên cứu cắt ngang được thực hiện trên 200 hộ chăn nuôi lợn ở tỉnh Phú Thọ và tỉnh Quảng Ninh từ tháng 7 đến tháng 10 năm 2017 nhằm bước đầu khảo sát sự lưu hành kháng thể kháng virus PRRS và xác định các yếu tố nguy cơ có liên quan đến tình trạng huyết thanh dương tính đối với virus này. Thông tin về đặc điểm trang trại và các biện pháp thực hành trong chăn nuôi và 400 mẫu huyết thanh đã được thu thập. Kết quả nghiên cứu cho thấy một số biện pháp thực hành và quản lý trang trại liên quan đến an toàn sinh học, phòng ngừa và kiểm soát dịch bệnh trong chăn nuôi lợn chưa được các hộ chăn nuôi chú trọng, đó là: Thực hiện biện pháp cùng nhập-cùng xuất; cách ly lợn mới mua; còn trên 13% số hộ chăn nuôi không xử lý chất thải. Tỷ lệ số hộ tiêm phòng vaccin lợn tai xanh rất thấp, ở tỉnh Phú Thọ tỷ lệ tiêm phòng chỉ đạt 9% và ở tỉnh Quảng Ninh tỷ lệ này là 20%. Tỷ lệ lưu hành huyết thanh dương tính virus PRRS ở lợn chưa tiêm phòng là 20% và 15% ở tỉnh Phú Thọ và tỉnh Quảng Ninh. Các yếu tố nguy cơ liên quan đến huyết thanh dương tính virus PRRS bao gồm chăn nuôi gần ao hồ công cộng, không xử lý chất thải chăn nuôi, không định kỳ sử dụng hóa chất khử trùng chuồng trại.

Từ khóa: Nghiên cứu cắt ngang, yếu tố nguy cơ, huyết thanh dương tính, kháng kháng thể, virus PRRS, tỉnh Phú Thọ, tỉnh Quảng Ninh.

Risk factors associated with seropositivity to PRRS virus at household farm levels in Phu Tho and Quang Ninh provinces

Pham Minh Hang, Pham Thi Thu Thuy, Nguyen Viet Khong

SUMMARY

A cross-sectional study was conducted in 200 household pig farms in Phu Tho and Quang Ninh provinces from July-October 2017 to determine the prevalence of antibody to PRRSV and to identify possible risk factors associated with sero-positivity of this virus. The selected farms were visited, and interviewed to collect the information on farm characteristics and husbandry practices and 400 serum samples. The studied results showed that a series of farm sanitary and management practices relating to biosafety and epidemic prevention, such as: Input/output together measure; Isolation of new animal before introduction into the pig herd were not paid attention; More than 13% of households discharged pig manure directly into rivers and lakes and the rate of PRRS vaccination was very low, reaching only 9% in Phu Tho province and 20% in Quang Ninh province. The average PRRSV sero-prevalence in unvaccinated animals varied between 15% and 20% in Phu Tho province and Quang Ninh province. The main risk factors associated with PRRSV sero-positivity including pig farms located near the public ponds, animal wastes were untreated; and pens were not cleaned and disinfected periodically.

Keywords: Cross-sectional study, risk factors, sero-positivity, PRRSV, Phu Tho province, Quang Ninh province.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lợn tai xanh (Porcine reproductive and respiratory syndrome-PRRS) lần đầu tiên được phát hiện ở Mỹ năm 1987 và đến năm 1990, dịch

đã lan rộng khắp Bắc Mỹ (Christianson và cs, 1994). Cũng năm 1990, tại châu Âu, Đức là nước đầu tiên thông báo có dịch PRRS và tiếp theo là Hà Lan, Bỉ và Tây Ban Nha (OIE, 1992). Virus

PRRS lần đầu tiên được phân lập ở Hà Lan năm 1991 (chủng Lelystad) và thời gian ngắn sau đó ở Mỹ (chủng VR-2332). Cả hai chủng được xác định hai kiểu gen chính của virus PRRS, kiểu gen 1 (châu Âu) và kiểu gen 2 (Bắc Mỹ). Hai kiểu gen này gây ra những dấu hiệu lâm sàng tương tự nhưng khác biệt đáng kể về di truyền và tính kháng nguyên (Labarque và cs, 2004). Là một RNA virus, virus PRRS có khuynh hướng đột biến và theo thời gian, tính đa dạng của cả hai kiểu gen đã gia tăng, dẫn đến sự xuất hiện của một loạt các chủng mới nổi hoặc tái nổi với nhiều kiểu hình và gen khác nhau (Kappes và cs, 2015). Bên cạnh đó, có nhiều cơ chế lây nhiễm virus đã được mô tả như lây nhiễm trực tiếp thông qua sự di chuyển của lợn và gián tiếp qua đồ dùng, côn trùng, tinh dịch hoặc không khí (Pitkin và cs, 2009). Sự đa dạng di truyền ngày càng tăng và sự phức tạp trong cơ chế lây nhiễm virus dẫn đến làm suy yếu hiệu quả của vacxin và biện pháp kiểm soát dịch nếu chỉ dựa trên việc tiêm phòng.

Kháng thể kháng virus PRRS (phát hiện bởi phương pháp ELISA) tăng lên khoảng 9 - 13 ngày sau khi nhiễm virus và giảm đi theo thời gian, tồn tại đến 28 tháng (Desrosiers và Boutin, 2002). Lợn bài thải virus trong vòng 3 - 4 tháng sau khi phơi nhiễm. Chính vì thế, hầu hết lợn có huyết thanh dương tính nhưng đều âm tính với virus PRRS và huyết thanh dương tính là một chỉ số của việc nhiễm virus hoặc tiêm phòng trước đó. Huyết thanh dương tính ở lợn chưa tiêm phòng trong một trang trại cho thấy sự hiện diện của virus tại trang trại đó (Wills và cs, 2003).

Dịch lợn tai xanh xuất hiện ở Quảng Ninh năm 2010 làm cho 10.729 lợn mắc tại 9 huyện; năm 2012 có 12.658 lợn mắc tại 8 xã; năm 2013: dịch xảy ra tại hai huyện với 237 con; năm 2014: xuất hiện 1 ổ dịch với 29 con mắc; năm 2017: tại huyện Đông Triều có 252 con mắc; năm 2018 : có 58 con mắc ghép tai xanh và dịch tả lợn. Tại Phú Thọ năm 2012 có 3080 lợn mắc tại 11 xã/phường. Bên cạnh đó Quảng Ninh là một tỉnh ven biển, có biên giới với Trung Quốc, các hoạt động vận chuyển, buôn bán lợn kể cả lợn nhập lậu, các hoạt động thương mại, du lịch rất phát

triển. Tỉnh Phú Thọ với vị trí tiếp giáp với 6 tỉnh/thành trong đó có thành phố Hà Nội, có nhiều tuyến giao thông, nhiều nút giao cao tốc (như Nội Bài - Lào Cai), nhiều cầu, bến đò, bến phà, do đó việc kiểm soát vận chuyển lợn vào địa bàn hết sức phức tạp. Cộng với chăn nuôi lợn ở cả hai tỉnh chủ yếu là chăn nuôi nhỏ lẻ, manh mún, thiếu áp dụng các biện pháp an toàn sinh học nên nguy cơ lợn phơi nhiễm với virus (hay huyết thanh dương tính với virus PRRS) ở đàn lợn nuôi của hai tỉnh này là cao.

Để có cơ sở khoa học cho việc lựa chọn những biện pháp phòng dịch hiệu quả, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đề tài “*Yếu tố nguy cơ liên quan đến huyết thanh dương tính virus PRRS mức hộ chăn nuôi ở tỉnh Phú Thọ và Quảng Ninh*” để tìm ra yếu tố nguy cơ nào là chính dẫn đến đàn lợn nuôi tiếp xúc với virus PRRS.

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

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Đánh giá thực trạng áp dụng các biện pháp thực hành và quản lý liên quan đến an toàn sinh học, phòng ngừa và kiểm soát dịch bệnh trong chăn nuôi lợn

- Khảo sát sự lưu hành huyết thanh dương tính virus PRRS ở đàn lợn nuôi tại hai tỉnh Phú Thọ và Quảng Ninh

- Xác định các yếu tố nguy cơ liên quan đến huyết thanh dương tính virus PRRS.

2.2. Nguyên liệu

- 400 mẫu huyết thanh lợn được thu thập tại các hộ chăn nuôi trên địa bàn hai Tỉnh Phú Thọ và Quảng Ninh. Huyết thanh lấy ở lợn trên 3 tuần tuổi chưa tiêm phòng vacxin PRRS. Đối với lợn dưới 3 tuần tuổi không lấy huyết thanh do thời điểm này lợn con vẫn còn kháng thể thụ động từ mẹ truyền sang nếu lợn mẹ được tiêm phòng vacxin PRRS trước đó.

- Kit IDEXX PRRS X3 Ab Test (IDEXX, Westbrook, USA).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Số lượng mẫu được tính theo công thức (Thông tư số 14/2016/TT-BNNPTNT ngày 2 tháng 6 năm 2016)

$$n = [1 - (1 - p)^{\frac{1}{d}}] \times [N - \frac{d-1}{2}]$$

n: Số mẫu cần lấy

p: Xác suất để phát hiện được bệnh (0,95)

d: Số con mắc bệnh (d=NxP)

P: Tỷ lệ hiện mắc dự đoán (2%)

N: Tổng đàn vật nuôi

+ Số hộ được chọn để điều tra và lấy mẫu là 200 hộ

Mục đích của nghiên cứu này là tìm hộ bệnh (hộ có lợn chưa tiêm phòng có huyết thanh dương tính với virus PRRS) và hộ chứng (hộ có lợn chưa tiêm phòng có huyết thanh âm tính với virus

PRRS) để xác định các yếu tố nguy cơ. Do đó, số mẫu lấy ở đây là số lượng hộ chăn nuôi được chọn để phỏng vấn và lấy mẫu huyết thanh lợn. Do không có số liệu về tổng số hộ chăn nuôi lợn ở hai tỉnh Phú Thọ và Quảng Ninh, chúng tôi giả định tổng số hộ chăn nuôi mỗi tỉnh là ∞ với tỷ lệ số hộ hiện mắc dự đoán 3% thì số hộ được chọn để lấy mẫu theo công thức trên là 98 hộ/tỉnh. Tuy nhiên để thuận tiện cho việc điều tra và lấy mẫu, chúng tôi đã tăng số hộ cần điều tra là 100 hộ/tỉnh và tổng số hộ cần điều tra cho cả hai tỉnh là 200 hộ.

+ Số mẫu huyết thanh cần lấy là: 400 mẫu

Với tỷ lệ hiện mắc dự đoán tại mỗi hộ chăn nuôi là 60%, số mẫu huyết thanh cần được lấy tại một hộ là 2 mẫu.

Tổng số mẫu huyết thanh cần được lấy tại hai tỉnh: 2 mẫu/hộ x 100 hộ/tỉnh x 2 tỉnh = 400 mẫu.

Phân bố số lượng hộ điều tra và lấy mẫu của hai tỉnh được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Phân bố số lượng hộ điều tra và lấy mẫu tại tỉnh Quảng Ninh và Phú Thọ

Phú Thọ				Quảng Ninh			
Huyện	Xã	Số phiếu điều tra	Số mẫu huyết thanh	Huyện	Xã	Số phiếu điều tra	Số mẫu huyết thanh
Phù Ninh	Trị Quân	30	60	Hoành Bồ	Sơn Dương	13	26
	Chu Hóa	6	12		Trôi	12	24
	Kim Đức	6	12		Minh Thành	12	24
TP. Việt Trì	Vân Phú	6	12	Quảng Yên	Hiệp Hòa	13	26
	Minh Nông	6	12		Uông Bí	13	26
	Thanh Đình	6	12		Phương Đông	12	24
	Thụy Vân	5	10		An Sinh	13	26
Lâm Thao	Vĩnh Lại	5	10	Đông Triều	Bình Khê	12	24
	Tiến Kiên	5	10				
	TT Lâm Thao	5	10				
	Sơn Dương	3	6				
	Sơn Vi	3	6				
	Cao Xá	5	10				
	Kinh Kệ	4	8				
	Tứ Xã	5	10				
Tổng		100	200	Tổng		100	200

Những huyện, xã được chọn để điều tra và lấy mẫu tại hai tỉnh là những huyện, xã trước nghiên cứu đã xảy ra dịch tai xanh hoặc những huyện, xã có nguy cơ cao (như có tuyến giao thông liên tỉnh hoặc nút giao cao tốc đi qua). Do đó số huyện, số xã tại mỗi tỉnh sẽ khác nhau như đã trình bày ở bảng 1.

- Phương pháp lấy mẫu huyết thanh, bảo quản, và vận chuyển mẫu: TCVN8400-21:2014

- Phản ứng ELISA: theo quy trình của nhà sản xuất.

- Xử lý số liệu bằng phần mềm thống kê Minitab phiên bản 17 (Minitab Inc), ứng dụng trong phân tích hồi quy để tính tỷ số chênh (odds ratio, OR) và 95% khoảng tin cậy (CI). Giá trị $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

- Xác định các yếu tố nguy cơ liên quan đến huyết thanh dương tính virus PRRS ở lợn chưa tiêm phòng: Theo phương pháp nghiên cứu bệnh - chứng (Nguyễn Như Thanh, 2011).

Trong đó chọn hộ quy định như sau:

Hộ chăn nuôi có ít nhất một lợn chưa tiêm phòng có huyết thanh dương tính với virus PRRS là hộ bệnh

Hộ chăn nuôi có lợn chưa tiêm phòng có huyết thanh âm tính với virus PRRS là hộ chứng.

- + OR = 1: Không có ảnh hưởng của yếu tố nguy cơ lên xác suất lợn có huyết thanh dương tính với virus PRRS

- + OR > 1: Lợn khi phơi nhiễm yếu tố nguy cơ có khả năng huyết thanh dương tính với virus PRRS tăng lên

- + OR < 1: Nguy cơ lợn có huyết thanh dương tính với virus PRRS giảm đi.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thực trạng áp dụng các biện pháp thực hành và quản lý liên quan đến an toàn sinh học, phòng ngừa và kiểm soát dịch bệnh trong chăn nuôi lợn

Đây là nghiên cứu đầu tiên được tiến hành để

đánh giá thực trạng áp dụng các biện pháp thực hành và quản lý liên quan đến an toàn sinh học, phòng ngừa và kiểm soát dịch bệnh trong chăn nuôi lợn của các hộ chăn nuôi trên địa bàn hai tỉnh Phú Thọ và Quảng Ninh. Kết quả nghiên cứu được tóm tắt và trình bày ở bảng 2.

Thức ăn là chất dinh dưỡng thiết yếu đáp ứng nhu cầu cho lợn để duy trì, tăng trưởng, sinh sản, tiết sữa và các chức năng khác. Việc cung cấp đầy đủ và chất lượng của thức ăn là vấn đề cốt lõi để duy trì sức khỏe cho lợn. Lợn được cho ăn đúng cách có khả năng chống lại nhiều bệnh do virus, vi khuẩn và ký sinh trùng gây ra chính là do tăng sản xuất kháng thể, cải thiện khả năng miễn dịch với các bệnh hoặc các yếu tố khác. Ngoài ra, dinh dưỡng hợp lý là điều cần thiết để lợn phục hồi nhanh chóng từ dịch bệnh. Kết quả điều tra ở bảng 2 cho thấy tại Phú Thọ, thức ăn hỗn hợp hoàn chỉnh được 46,1% số hộ sử dụng, thức ăn chăn nuôi thương mại và thức ăn chăn nuôi truyền thống được 39,2% và 14,7% hộ sử dụng, không có hộ nào sử dụng thức ăn thu gom. Ngược lại tại Quảng Ninh, tỷ lệ hộ sử dụng thức ăn chăn nuôi truyền thống là cao nhất (55,6%), tiếp đến là thức ăn hỗn hợp hoàn chỉnh là 39,2% và thức ăn chăn nuôi thương mại chỉ có 5,2% số hộ sử dụng. Cũng như tỉnh Phú Thọ, trong 100 hộ điều tra tại tỉnh Quảng Ninh, không có hộ nào sử dụng thức ăn thu gom. Điều này cho thấy hình thức chăn nuôi nhỏ lẻ với số lượng ít và tận dụng nguồn thức ăn có sẵn (chế phẩm sinh hoạt hàng ngày để cho chăn nuôi) đã giảm xuống rất nhiều, thay vào đó các trang trại, các hộ chăn nuôi có quy mô lớn ngày càng nhiều hơn và việc sử dụng thức ăn hỗn hợp hoàn chỉnh cũng tăng hơn.

Nước sạch là nền tảng cho tất cả các sinh vật sống trong đó có động vật chăn nuôi. Nước chiếm tới 82% trọng lượng của lợn con và 55% trọng lượng lợn trưởng thành. Nhìn chung, lợn có xu hướng uống lượng nước khoảng 10% trọng lượng của chúng mỗi ngày hoặc gấp 2 lần lượng thức ăn chúng ăn. Tỷ lệ mắc bệnh, lượng thức ăn tiêu thụ, tốc độ tăng trưởng và hiệu quả của thức ăn bị ảnh hưởng bởi chất

Bảng 2. Kết quả thực trạng áp dụng các biện pháp thực hành và quản lý liên quan đến an toàn sinh học, phòng ngừa và kiểm soát dịch bệnh trong chăn nuôi lợn

Yếu tố liên quan	Phú Thọ - Tỷ lệ (%)	Quảng Ninh - Tỷ lệ (%)
<i>Loại thức ăn sử dụng trong chăn nuôi</i>		
Thức ăn hỗn hợp hoàn chỉnh	46,1	39,2
Thức ăn chăn nuôi thương mại	39,2	5,2
Thức ăn chăn nuôi truyền thống	14,7	55,6
Thức ăn thu gom	0	0
<i>Nguồn nước sử dụng trong chăn nuôi</i>		
Nước máy	21	96,5
Nước giếng	79	3,5
Nước ao, hồ	0	0
Nước mưa	0	0
<i>Phương pháp thụ tinh</i>		
Thụ tinh nhân tạo	73,1	82,7
Lợn đực giống	26,9	17,3
<i>Cùng xuất - cùng nhập trong chăn nuôi</i>		
Có	35	46
Không	65	54
<i>Nuôi cách ly lợn giống mới mua về</i>		
Có	67,3	46,2
Không	32,7	53,8
<i>Vệ sinh chuồng trại</i>		
Hàng ngày	92	57
2 – 3 lần/tuần	0	16
Hàng tuần	6	15
Hàng tháng	2	12
<i>Tình trạng xử lý chất thải trong chăn nuôi</i>		
Ủ bio-gas	55	27,3
Làm phân bón trực tiếp cho rau	9	5,5
Không xử lý chất thải (thải thẳng ra ao, hồ..)	13	14,5
Xử lý bằng chế phẩm sinh học	13	24,5
Nuôi cá	10	28,2
<i>Tiêm phòng vắc xin lợn tai xanh</i>		
Tiêm phòng	9	20
Không tiêm phòng	91	80

lượng nước được cung cấp. Chất lượng nước cung cấp trong chăn nuôi lợn được đánh giá theo 5 tiêu chí: Vi sinh vật tổng số, pH, độ cứng, chất rắn hòa tan, nitrat và nitrit (Torrey và cs, 2008). Theo kết quả ở bảng 2 tại Phú

Thọ, khoảng 79% số hộ điều tra sử dụng nước giếng trong chăn nuôi và 21% số hộ dùng nước máy, không có hộ nào sử dụng nước ao hồ và nước mưa. Tại Quảng Ninh, 96,5% hộ sử dụng nước máy, chỉ có 3,5% sử dụng nước giếng

khoan và không có hộ nào sử dụng nước ao, hồ và nước mưa. Tuy nhiên, hầu hết các hộ chăn nuôi không kiểm tra chất lượng nguồn nước giếng khoan.

Thụ tinh nhân tạo (AI) ở lợn được thực hiện rộng rãi tại các nước chăn nuôi với số lượng lớn. Đây là một công cụ rất hữu ích để đưa các gen ưu việt vào đàn lợn nái với nguy cơ lây truyền bệnh thấp nhất. Tuy nhiên, tác động của tinh dịch bị nhiễm với các mầm bệnh có thể rất lớn. Hầu hết các vi sinh vật được phát hiện trong tinh dịch lợn được coi là không gây bệnh, nhưng một số mầm bệnh (ví dụ như virus PRRS hay PCV2) có thể gây ra thiệt hại lớn về kinh tế. Sự nhiễm vi sinh vật của tinh dịch có thể là do nhiễm trùng đường tiết niệu, nhiễm trùng đường sinh dục của lợn đực hoặc có thể xảy ra trong khi thu thập, xử lý và lưu trữ tinh dịch. Nó có thể dẫn đến giảm chất lượng tinh dịch, gây chết phôi thai, viêm nội mạc tử cung, nhiễm trùng toàn thân hoặc dịch bệnh ở lợn cái (Maes và cs, 2008). Kết quả điều tra cho thấy phương pháp thụ tinh cho lợn được đa số hộ chăn nuôi sử dụng với tỷ lệ 73,1% ở Phú Thọ và 82,7% ở Quảng Ninh. Nhưng việc xét nghiệm các mầm bệnh trong tinh dịch lợn cũng chưa có hộ nào thực hiện.

Thực hiện biện pháp cùng nhập - cùng xuất ngăn ngừa sự nhiễm bệnh và sự tích tụ dịch bệnh. Vi sinh vật truyền nhiễm có hai nguồn chính: lợn và môi trường. Sự lây nhiễm từ những lợn khác đàn giảm xuống hoặc bị loại bỏ trong hệ thống cùng nhập - cùng xuất vì chỉ một nhóm lợn có cùng độ tuổi, miễn dịch và lịch sử bệnh được giữ lại, không có lợn khác đàn đưa vào đó. Lây nhiễm từ môi trường bị giảm hoặc loại bỏ trong hệ thống này vì chuồng trại đã được làm sạch và được khử trùng giữa các đợt nuôi. Kết quả điều tra chỉ ra rằng tỷ lệ số hộ không thực hiện cùng xuất - cùng nhập trong chăn nuôi là cao, Phú Thọ 65% và Quảng Ninh 54%. Tuy nhiên tại Phú Thọ có 67,3% số hộ nuôi cách ly lợn mới mua về, tại Quảng Ninh thì tỷ lệ này chỉ là

46,2%. Vệ sinh hàng ngày được các hộ chăn nuôi ở Phú Thọ chú trọng, chiếm 92% số hộ được phỏng vấn. Tại Quảng Ninh, số hộ vệ sinh hàng ngày chỉ chiếm 57%.

Xử lý chất thải trong chăn nuôi đang là vấn đề quan tâm hàng đầu. Phú Thọ có 55% số hộ sử dụng biện pháp biogas, chiếm tỷ lệ cao nhất và thấp nhất là làm phân bón trực tiếp cho rau (9%). Tại Quảng Ninh, tỷ lệ số hộ xử lý chất thải bằng nuôi cá chiếm tỷ lệ cao nhất và cũng như Phú Thọ, rất ít hộ sử dụng làm phân bón cho rau (5%). Xử lý chất thải bằng chế phẩm sinh học cũng đã được một số hộ chăn nuôi sử dụng, Phú Thọ 13% và Quảng Ninh 24,5%. Tuy vậy, vẫn còn 13% số hộ chăn nuôi tại Phú Thọ và 14,5% tại Quảng Ninh xả thẳng chất thải ra môi trường (bảng 2).

Các biện pháp được sử dụng hiện tại để kiểm soát dịch lợn tai xanh bao gồm biện pháp quản lý, an toàn sinh học, giám sát và tiêm phòng (Corzo và cs, 2010). Tiêm phòng được sử dụng cho mục đích giảm tổn thất lâm sàng, nhưng không phòng được sự nhiễm virus. Tiêm phòng vacxin có chi phí thấp nhất đối với chăn nuôi công nghiệp và khả thi đối với tất cả các loại hình chăn nuôi (trang trại, nông hộ, nhỏ lẻ) so với các chiến lược kiểm soát dịch lợn tai xanh khác. Kết quả điều tra cho thấy tỷ lệ tiêm phòng vacxin PRRS ở Phú Thọ rất thấp (9%) và ở Quảng Ninh, tỷ lệ này là 20% (bảng 3). Như vậy việc tiêm phòng ở các hộ chăn nuôi vẫn chưa được người dân chú trọng. Do đó chính quyền địa phương cần có biện pháp chỉ đạo quyết liệt hơn để đẩy mạnh công tác tiêm phòng, đặc biệt ở những hộ chăn nuôi nhỏ lẻ.

3.2. Kết quả khảo sát sự lưu hành kháng thể kháng virus PRRS ở lợn chưa tiêm phòng vacxin tại hai tỉnh Quảng Ninh và Phú Thọ

Để khảo sát sự lưu hành huyết thanh dương tính virus PRRS, tổng số 400 mẫu huyết thanh được thu thập ngẫu nhiên ở lợn (lợn trên 3 tuần tuổi chưa tiêm phòng) thuộc 200 hộ chăn nuôi trên địa bàn hai tỉnh Quảng Ninh và Phú Thọ đã được kiểm tra bằng phương pháp ELISA (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả huyết thanh dương tính virus PRRS ở lợn chưa tiêm phòng tại Phú Thọ và Quảng Ninh

Địa phương	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính (Tỷ lệ dương tính %)	Số hộ có huyết thanh dương tính
Phú Thọ	200	40 (20)	23
Quảng Ninh	200	30 (15)	25
Tổng	400	70 (17,5)	48

Qua khảo sát cho thấy, có 20% số mẫu huyết thanh lợn ở tỉnh Phú Thọ và 15% số mẫu huyết thanh lợn ở Quảng Ninh dương tính với virus PRRS (bảng 3). Như vậy ở lợn chưa được tiêm phòng có tỷ lệ nhỏ tiếp xúc với nguồn bệnh trong tự nhiên biểu hiện qua huyết thanh dương tính. Nghĩa là mầm bệnh có lưu hành ngoài môi trường tự nhiên và các đối tượng lợn chưa được tiêm phòng tiếp xúc với chúng đều tiềm ẩn nguy cơ mắc và bùng phát dịch.

3.3. Phân tích các yếu tố nguy cơ lây nhiễm virus PRRS

Mặc dù thực hiện nhiều biện pháp kiểm soát bao gồm cả tiêm chủng, cải tiến công tác thực hành quản lý hoặc di truyền-giống, PRRS vẫn tiếp tục trở thành một vấn đề lớn đối với các hộ chăn nuôi lợn. Sự phân bố rộng rãi của virus PRRS và nguy cơ tái xuất hiện ở đàn lợn nuôi sau khi diệt trừ đã làm suy yếu nỗ lực kiểm soát dịch. Do đó, việc nhận biết các yếu tố nguy cơ là bước quan trọng để xác định và thực hiện các biện pháp kiểm soát dịch bệnh và thiết kế chiến lược giám sát hiệu quả (Velasova và cs, 2012).

Các yếu tố nguy cơ được nhận biết trên cơ sở phân tích mối quan hệ giữa việc thực hiện các biện pháp an toàn sinh học và thực trạng lưu hành của huyết thanh dương tính virus PRRS tại khu chuồng nuôi được áp dụng trong nghiên cứu này và kết quả được trình bày ở bảng 4.

Hiện nay, tình trạng ô nhiễm môi trường nước ao, hồ ở nhiều vùng nông thôn đang ở mức báo động. Nguyên nhân là do việc xả nước thải sinh hoạt, chất thải chăn nuôi trực tiếp ra môi trường làm cho nguồn nước bị ô nhiễm nghiêm

trọng. Bên cạnh đó, nước thải từ các vùng có dịch bệnh, các khu giết mổ tập trung còn chứa nhiều loại vi sinh vật gây bệnh có khả năng ngấm vào nguồn nước ngầm. Một số hộ chăn nuôi do nhận thức kém về an toàn sinh học đã vứt xác lợn chết ra các ao hồ công cộng. Hay để tận dụng chất thải của lợn để nuôi cá, nhiều hộ chăn nuôi đã xây chuồng trại ngay cạnh các ao, hồ công cộng và sử dụng nước ao hồ rửa chuồng trại. Do đó các trại chăn nuôi ở gần những ao hồ ô nhiễm này sử dụng nước giếng khoan không qua xử lý cho lợn uống hoặc sử dụng nước ao hồ để rửa chuồng trại, lợn sẽ có nguy cơ tiếp xúc với virus (hay có huyết thanh dương tính virus PRRS) cao hơn ở những trại chăn nuôi nằm cách xa là 3,3 lần (bảng 3).

Virus PRRS có thể được phát tán từ lợn bị bệnh sang lợn khỏe thông qua ô nhiễm phân. Nghiên cứu của Linhares và cs (2012) cho thấy thời gian bán phân hủy virus PRRS dựa trên nhiệt độ ủ của phân. Ở nhiệt độ 40°C, thời gian bán hủy là 1,6-1,7h và ở 60°C là 2,9-8,5 phút. Nguồn chất thải đã gây ô nhiễm đất đai và nguồn nước đe dọa trực tiếp tới sức khỏe của động vật nuôi và con người. Do đó, ở các hộ xả thẳng chất thải chăn nuôi ra môi trường xung quanh, lợn có nguy cơ huyết thanh dương tính virus PRRS cao gấp 4,8 lần so với lợn được nuôi ở các hộ có áp dụng các biện pháp xử lý chất thải (bảng 4). Kết quả nghiên cứu của Lại Thị Lan Hương và cs (2017) cũng cho thấy việc xả thẳng chất thải ra môi trường làm nguy cơ tăng 4 lần.

Đã có nhiều công trình nghiên cứu chỉ ra rằng sử dụng các hóa chất khử trùng phù hợp có thể loại bỏ virus PRRS từ các

phương tiện vận chuyển, từ dụng cụ chăn nuôi và chuồng nuôi. Do đó với những hộ không sử dụng hóa chất khử trùng chuồng trại, lợn sẽ có nguy cơ huyết thanh dương tính virus PRRS cao hơn ở lợn nuôi tại các

hộ có sử dụng là 3 lần (bảng 4). Các kết quả nghiên cứu của Nguyễn Đức Hiền (2012), Lại Thị Lan Hương và cs (2017) cũng cho thấy yếu tố này làm tăng nguy cơ lây nhiễm tăng gấp 3,11 và 5,62 lần.

Bảng 4. Kết quả phân tích một số yếu tố nguy cơ liên quan đến huyết thanh dương tính virus PRRS

Biến nguy cơ	Phân loại	Hộ bệnh	Hộ chứng	Tỷ số chênh (OR)	95% CI	P value
1. Chăn nuôi >8 lợn/ô chuồng	Có	24	107	0,42	0,2-0,8	0,01
	Không	24	45			
2. Chăn nuôi lợn gần khu dân cư	Có	21	97	0,4	0,2-0,9	0,02
	Không	27	55			
3. Chăn nuôi lợn gần ao, hồ công cộng	Có	25	34	3,3	1,7-6,6	0,00
	Không	23	118			
4. Sử dụng thức ăn tự chế	Có	17	40	1,5	0,8-3,1	0,23
	Không	31	112			
5. Sử dụng nước giếng khoan	Có	18	53	1,12	0,6-2,2	0,74
	Không	30	99			
6. Tự sản xuất con giống	Có	26	66	1,54	0,8-3	0,19
	Không	22	86			
7. Thụ tinh nhân tạo	Có	14	83	0,34	0,2-0,7	0,00
	Không	34	69			
8. Xả thẳng chất thải ra ngoài môi trường	Có	18	17	4,8	2,2-10,3	0,00
	Không	30	135			
9. Thực hiện việc cùng nhập - cùng xuất	Có	20	77	0,7	0,4-1,3	0,27
	Không	28	75			
10. Sử dụng hóa chất khử trùng chuồng trại	Có	27	46	3	1,5-5,8	0,00
	Không	21	106			
11. Cách ly lợn giống mới mua về	Có	16	82	0,43	0,2-0,8	0,01
	Không	32	70			
12. Vệ sinh chuồng trại hàng ngày	Có	11	38	0,89	0,4-1,9	0,77
	Không	37	114			
13. Vệ sinh máng ăn hàng ngày	Có	15	37	1,4	0,7-2,9	0,34
	Không	33	115			

Các biến: Sử dụng thức ăn tự chế, sử dụng nước giếng khoan, tự sản xuất con giống, không vệ sinh máng ăn hàng ngày, mặc dù có tỷ số chênh (OR>1) nhưng giá trị p>0,05 và ngược lại các biến: Chăn nuôi >8 lợn/ô

chuồng, chăn nuôi lợn gần khu dân cư, thụ tinh nhân tạo, không cách ly lợn giống mới mua về có tỷ số chênh (OR<1) nhưng giá trị p<0,05 không liên quan đến huyết thanh dương tính virus PRRS.

IV. KẾT LUẬN

- Một số biện pháp thực hành và quản lý liên quan đến an toàn sinh học, phòng ngừa và kiểm soát dịch bệnh trong chăn nuôi lợn tại 200 hộ chăn nuôi thuộc 2 tỉnh Phú Thọ và Quảng Ninh chưa được các hộ chăn nuôi chú trọng: Thực hiện biện pháp cùng nhập - cùng xuất; cách ly lợn mới mua hoặc còn trên 13% số hộ chăn nuôi xả thải chất thải ra môi trường. Tỷ lệ số hộ tiêm phòng vacxin lợn tai xanh rất thấp, Phú Thọ 9% và Quảng Ninh 20%.

- Tỷ lệ lưu hành huyết thanh dương tính virus PRRS trước tiêm phòng là 20% tại Phú Thọ và 15% tại Quảng Ninh.

- Các yếu tố: Chăn nuôi lợn gần ao hồ công cộng, xả thải chất thải ra ngoài môi trường, không sử dụng hóa chất khử trùng chuồng trại có nguy cơ làm tăng huyết thanh dương tính virus PRRS trước tiêm phòng từ 3 đến 4,8 lần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Christianson WT, Joo H (1994). Porcine reproductive and respiratory syndrome: a review. *Swine Health and Production* 2(2):10–28
- Corzo CA, Mondaca E, Wayne S, Torremorell M, Dee S, Davies P, Morrison RB (2010). Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 154:185–192
- Desrosiers R, Boutin M (2002). An attempt to eradicate porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) after an outbreak in a breeding herd: Eradication strategy and persistence of antibody titers in sows. *Journal of Swine Health and Production* 10:23-25
- Kappes MA, Faaberg KS (2015). PRRSV structure, replication and recombination: origin of phenotype and genotype diversity. *Virology* 479-480:475–86
- Labarque G, Reeth KV, Nauwynck H, Drexler C, Gucht SV, Pensaert M (2004). Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine* 22(31–32):4183–4190.
- Lại Thị Lan Hương, Phạm Minh Hằng, Nguyễn Viết Không (2017). Tình hình chăn nuôi và dịch lợn tai xanh trên đàn lợn nuôi tại tỉnh Nam Định và Thái Bình (2012-2014), yếu tố nguy cơ lây nhiễm virus PRRS. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y XXIV*: 15-23
- Linhares DC, Torremorell M, Joo HS, Morrison RB (2012). Infectivity of PRRS virus in pig manure at different temperatures. *Vet Microbiol.* 160(1-2):23-28.
- Nguyễn Đức Hiền (2012). Tình hình nhiễm hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản (PRRS) và một số yếu tố nguy cơ trong lan truyền bệnh giữa các đàn heo tại thành phố Cần Thơ. *Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ* 22c: 96-105
- Nguyễn Như Thanh (2011). Giáo trình phương pháp nghiên cứu dịch tễ học thú y. *NXB Khoa học tự nhiên và Công nghệ*
- OIE: Animal Health Status and Disease Control Methods (Part One: Reports). *World Animal Health* 1991 1992, VII(2):126.
- Pitkin A, Deen J, Dee S (2009). Further assessment of fomites and personnel as vehicles for the mechanical transport and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res* 73:298–302.
- Velasova M, Alarcon P, Williamson S, Wieland B (2012). Risk Factors for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection and Resulting Challenges for Effective Disease Surveillance. *BMC Veterinary Research* 8: 184.
- Wills RW, Doster AR, Galeota JA, Sur JH, Osorio FA (2003). Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 58-62

Ngày nhận 14-12-2018

Ngày phản biện 6-4-2019

Ngày đăng 1-5-2019

MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM BỆNH LÝ Ở LỢN CON TIÊU CHẢY DO ROTAVIRUS

*Đào Lê Anh, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Thị Hạnh,
Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Thị Ngọc, Lê Văn Hùng
Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

TÓM TẮT

Đã thu thập 103 mẫu lợn con tiêu chảy tại 6 tỉnh phía Bắc để nghiên cứu mức độ tổn thương đại thể và vi thể của bệnh do Rotavirus gây ra. Kết quả nghiên cứu bằng kỹ thuật RT-PCR cho thấy có 14 mẫu dương tính với Rotavirus và không có sự đồng nhiễm với một số tác nhân virus, vi khuẩn khác. Thông kê triệu chứng lâm sàng ở lợn con tiêu chảy do Rotavirus cho thấy triệu chứng tập trung ở hệ tiêu hóa, cụ thể là tiêu chảy (100%); phân vàng hoặc trắng có lẫn cặn sữa, có bọt khí (85,71%). Ngoài ra, lợn mắc bệnh còn có biểu hiện ủ rũ, mệt mỏi, lười vận động, uống nhiều nước, bỏ ăn, giảm ăn, lợn hốc hác và gầy còm. Tổn thương đại thể chủ yếu xảy ra ở ruột non, thành ruột mỏng, căng ra, trong ruột chứa cặn sữa không tiêu (90-100%). Bệnh tích vi thể tập trung ở ruột. Tổn thương vi thể chủ yếu xảy ra ở đỉnh lông nhung ruột (100%), lông nhung cùn, teo dần nên làm giảm khả năng tiêu hóa, hấp thu các chất dinh dưỡng. Trên các đoạn ruột non, tổn thương vi thể nặng hơn ở đoạn tá tràng và không tràng với biểu hiện sung huyết, thâm nhiễm tế bào viêm và lông nhung bị ăn mòn ở hầu hết các mẫu nghiên cứu.

Từ khóa: Lợn con, Rotavirus, bệnh tích đại thể và vi thể.

Some pathological characteristics of the piglets suffering with diarrhea caused by Rotavirus

*Dao Le Anh, Nguyen Thi Lan, Nguyen Thi Hanh,
Nguyen Thi Thu Hang, Nguyen Thi Hoa, Nguyen Thi Ngoc, Le Van Hung*

SUMMARY

A total of 103 diarrheal piglet samples were collected in 6 Northern provinces, Viet Nam for study on the pathology caused by rotavirus. The results of RT-PCR technique showed that 14 samples were positive with rotavirus and co-infection with other virus and bacteria was not found. The clinical symptoms of the piglets suffering with diarrhea by rotavirus were detected mainly in the digestive system, the severe symptom was diarrhea (100%); yellow or white feces with milk residues (85.71%). In addition, the rotavirus infected pigs presented several clinic signs, such as: moodiness, tiredness, drinking plenty of water, loss appetite and decline. The necropsy result of the rotavirus infected piglets indicated that the lesions were mainly occurred in the small intestine, such as the intestinal wall was thin, stretched, containing milk residue (90-100%). The histological lesions were mainly occurred on top of the intestinal villi (100%), it was blunt, gradually disappeared, thus reduced digestibility, nutrition absorption. The lesions in the intestine segments were heavier than that on the duodenum and jejunum with the manifestations of congestive, inflammatory, infiltrated cells and corrosive villi in most of the studied samples.

Keywords: Piglet, Rotavirus, gross and histological lesions.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tiêu chảy ở lợn con là một trong những vấn đề nghiêm trọng và gây thiệt hại kinh tế cho người chăn nuôi. Rotavirus là một trong số nguyên nhân chủ yếu gây tiêu chảy cấp ở lợn con và ở trẻ em, và được cho là một tác nhân có khả năng truyền lây giữa động vật và người (Nguyễn Tuấn Anh và cs, 2007). Rotavirus thuộc họ Reoviridae và được chia thành 5 nhóm (group) khác nhau, bao gồm nhóm A, B, C, D, E. Trong 5 nhóm này thì Rotavirus nhóm A là quan trọng và nguy hiểm nhất vì sự lưu hành và tỷ lệ gây bệnh tiêu chảy cấp tính cao đối với cả người và gia súc. Genome của Rotavirus mang vật liệu di truyền là những đoạn phân tử RNA, gồm 11 phân đoạn mã hóa cho 6 protein cấu trúc (structural protein) và 6 protein không cấu trúc (nonstructural protein). Do genome của Rotavirus có cấu trúc phân đoạn nên có sự tái tổ hợp về gen giữa các chủng Rotavirus với nhau khi chúng cùng nhiễm vào một tế bào và tạo ra các chủng/biến chủng virus mới. Rotavirus nhóm A được chia thành các genotype khác nhau dựa vào loại protein glycoprotein (G) và protease-sensitive (P) nằm trên lớp vỏ protein bao bọc lõi virus. Ít nhất có 23 loại genotype G và 31 loại genotype P được ghi nhận trên thế giới hiện nay. Các G và P genotype mới không ngừng được tìm thấy trong thời gian gần đây, nói lên tính đa dạng của Rotavirus trong tự nhiên.

Trên thế giới, nghiên cứu các biến đổi bệnh lý do Rotavirus gây ra được cho là hết sức quan trọng vì nó góp phần tạo nền móng cho việc thiết lập chẩn đoán bệnh, do vậy các nghiên cứu đã được thực hiện từ lâu (Janke B.H. et al., 1987; Johannsen U. et al., 1976). Ở Việt Nam, đã có nhiều nghiên cứu đề cập đến sự có mặt cũng như vai trò của Rotavirus trong các trường hợp lợn con tiêu chảy, tuy nhiên tính đến thời điểm này, hầu như chưa có nghiên cứu về mô bệnh học liên quan đến tiêu chảy ở lợn con do Rotavirus gây ra. Mục tiêu của nghiên cứu là tìm hiểu đặc điểm bệnh lý của lợn con tiêu chảy do Rotavirus nhằm đánh giá thương tổn của bệnh do Rotavirus trên lợn con ở mức độ đại

thể và vi thể, từ đó cung cấp thông tin cho chẩn đoán lâm sàng và giải thích nguyên nhân vì sao lợn con bị bệnh giảm hấp thu và tiêu hóa.

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

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Xác định một số đặc điểm về triệu chứng của lợn con tiêu chảy do Rotavirus
- Bệnh tích đại thể của lợn con tiêu chảy do Rotavirus
- Biến đổi vi thể một số tổ chức nội tạng của lợn con tiêu chảy do Rotavirus.

2.2. Nguyên liệu

- Động vật lấy mẫu bệnh phẩm: Lợn con nghi mắc Rotavirus (0-28 ngày tuổi).
- Dụng cụ, hóa chất: Các dụng cụ, hóa chất, trang thiết bị tại Phòng thí nghiệm trọng điểm CNSH Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Hệ thống làm tiêu bản vi thể, kính hiển vi điện tử, máy PCR.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp quan sát: quan sát triệu chứng lâm sàng của lợn, chụp ảnh, ghi chép số liệu của từng cá thể và toàn đàn.
- Phương pháp mổ khám: Lợn bệnh được cố định trên bàn mổ hoặc khay mổ, mổ khám theo trình tự từ trên xuống dưới, bóc lột tất cả các khí quan để quan sát và tìm ra những biến đổi về bệnh tích đại thể.
- Phương pháp làm và nhuộm tiêu bản vi thể: những mẫu bệnh phẩm có các biến đổi đại thể được sử dụng cho nghiên cứu vi thể. Phương pháp làm tiêu bản vi thể theo quy trình tẩm đục bằng parafin, nhuộm Haematoxylin - Eosin (HE).
- Phương pháp RT-PCR.

Tách chiết ARN

Tiến hành tách chiết ARN tổng số theo hướng dẫn của bộ Kit tách chiết ARN của Ambion.

Cụ thể các bước tiến hành như sau: Mẫu bệnh phẩm được phân giải bằng 600 µl dung dịch LB-buffer, dùng chày nghiền mẫu, nghiền cho đến khi dung dịch phân giải hoàn toàn. Bổ sung 600µl cồn 70%. Chuyển toàn bộ huyền dịch trên sang cột lọc của Kit, sau đó rửa cột lọc hai lần bằng bộ đệm rửa Wash Buffer I, Wash Buffer II được cung cấp kèm theo Kit. Cuối cùng ARN được thu bằng 100 µl nước tinh khiết (kèm theo bộ Kit). DNA được bảo quản ở -20°C cho đến khi phân tích.

Phản ứng RT-PCR

Mẫu ARN sau khi tách chiết sẽ được tiến hành phản ứng RT-PCR theo bộ Kit Invitrogen. Cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu để nhân đoạn gen VP6 bao gồm :

Rota - set1 F (Forward primer): 5'-AAA

GAT GCT AGG GAC AAA ATT G- 3'

Rota - set1 R (Reverse primer): 5'-TTC
AGA TTG TGG AGC TAT TCC A-3'.

Chu kì nhiệt của phản ứng RT-PCR như sau: 45°C - 45 phút, 94°C - 2 phút, 35 chu kỳ (94°C - 30 giây, 45°C - 1 phút, 72°C - 1 phút), 72°C - 10 phút và cuối cùng giữ sản phẩm ở 4°C.

Điện di trên thạch và đọc kết quả sản phẩm RT-PCR

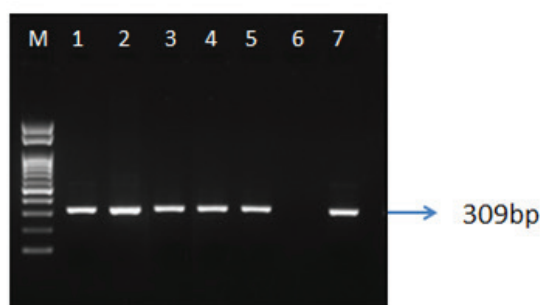
Sản phẩm RT-PCR được điện di trên bản thạch 1,2% trong dung dịch đệm TBE1X trong thời gian 35 phút ở hiệu điện thế 100V. Đọc kết quả điện di bằng tia UV tại bước sóng 254nm.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tỷ lệ nhiễm Rotavirus ở lợn con từ 0-28 ngày tuổi tại một số tỉnh phía Bắc

Bảng 1. Tỷ lệ nhiễm Rotavirus ở lợn con từ 0 - 28 ngày tuổi ở một số tỉnh phía Bắc

STT	Địa điểm	Số mẫu xét nghiệm	Kết quả phản ứng RT-PCR	
			Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
1	Hưng Yên	21	5	23,81
2	Hà Nam	18	3	16,67
3	Bắc Giang	17	2	11,76
4	Hải Dương	16	5	31,25
5	Bắc Ninh	15	0	0
6	Nam Định	16	1	6,25
Tổng		103	16	15,53



Hình 1. Kết quả chạy điện di sản phẩm phản ứng RT-PCR phát hiện Rotavirus

M: thang chuẩn Marker (100bp); giếng 1-5: mẫu ruột, phân của lợn nghi nhiễm Rotavirus; giếng 6: đối chứng âm; giếng 7: đối chứng dương (chủng virus Rota vaccin)

Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi tiến hành thu thập các mẫu phân lợn tiêu chảy từ một số trang trại lợn ở phía Bắc Việt Nam, tiến hành phản ứng RT-PCR xét nghiệm phát hiện Rotavirus, chúng tôi thu được kết quả theo bảng 1.

Qua bảng 1 cho thấy kết quả phản ứng RT-PCR đã phát hiện 16 mẫu lợn con từ 0 - 28 ngày tuổi dương tính với Rotavirus, chiếm tỷ lệ 15,53%. Số mẫu lợn con dương tính với Rotavirus được phát hiện ở 5/6 tỉnh phía Bắc gồm Hưng Yên, Hà Nam, Bắc Giang, Hải Dương và Nam Định. Không phát hiện mẫu nào dương tính với Rotavirus ở tỉnh Bắc Ninh. Như vậy, Rotavirus gây bệnh cho lợn con lưu hành khá rộng rãi ở khu vực phía Bắc nước ta.

Trên thế giới có nhiều kỹ thuật chẩn đoán bệnh do Rotavirus trên lợn như phân lập virus, test thử nhanh, RT-PCR, RT-qPCR, trong đó kỹ thuật RT-PCR được sử dụng phổ biến tại các phòng thí nghiệm để xác định tỷ lệ nhiễm Rotavirus trên lợn con. Bằng kỹ thuật này tại Canada, một nghiên cứu đã thu thập 96 mẫu lợn trên 24 ngày tuổi ở các lò mổ từ 2005-2007 xác định tỷ lệ lợn nhiễm Rotavirus là 8,3% (Martel et al., 2013). Cùng giai đoạn đó, bằng kỹ thuật RT-PCR, xác định được tỷ lệ nhiễm 6,5% với Rotavirus trên đối tượng lợn con 28-63 ngày tuổi tại Ireland 2007 (Collins et al., 2010).

Ở Việt Nam, nghiên cứu của Phạm Hồng Anh và cs (2014) công bố tỷ lệ nhiễm Rotavirus nhóm A là 32,7% từ các mẫu lợn con khỏe mạnh và lợn con tiêu chảy ở 4 tỉnh đồng bằng sông Mekong. Kết quả tỷ lệ nhiễm Rotavirus trên lợn con của chúng tôi thấp hơn, có thể do số lượng

mẫu thu thập còn ít nên chưa phản ánh được đầy đủ tỷ lệ lưu hành của Rotavirus trên đàn lợn.

Ngoài chẩn đoán sự có mặt của Rotavirus, tất cả các mẫu bệnh phẩm trên cũng được xác định sự có mặt của virus TGE, virus PED, virus PRRS, vi khuẩn *E.coli*, *Salmonella*, *Clostridium* và Coccidiosis. Kết quả chẩn đoán cho thấy có 14/16 mẫu cho kết quả âm tính với virus TGE, PED, vi khuẩn *E.coli*, *Salmonella* và Coccidiosis (số liệu không trình bày trong bài báo này). Lựa chọn 14 mẫu chỉ dương tính với Rotavirus để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả về tỷ lệ nhiễm Rotavirus cho thấy đã có sự hiện diện khá cao của virus trong môi trường, đồng thời chúng còn tồn tại lâu trong môi trường (phân, dụng cụ, trang thiết bị chăn nuôi...). Đây là yếu tố nguy cơ lan truyền bệnh cần quan tâm vì nó có ảnh hưởng đến sức khỏe con người, đặc biệt ở trẻ em. Ngoài gây bệnh trên lợn, Rotavirus còn là nguyên nhân gây tiêu chảy cấp ở các loài chăn nuôi như người, chuột, bò, cừu. Sự truyền lây tự nhiên giữa người và động vật có thể xảy ra bởi con đường truyền lây chủ yếu là từ nguồn nước và phân động vật gây nhiễm.

3.2. Triệu chứng lâm sàng của lợn con nhiễm Rotavirus

Thông qua kết quả phản ứng RT-PCR phát hiện mẫu dương tính với Rotavirus, chúng tôi tiến hành quan sát biểu hiện lâm sàng của lợn con tiêu chảy nhiễm Rotavirus. Các triệu chứng lâm sàng trên lợn con đã được chúng tôi theo dõi, quan sát, ghi chép lại thông tin qua các chủ hộ. Kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Triệu chứng lâm sàng ở lợn con tiêu chảy do Rotavirus

STT	Chỉ tiêu theo dõi	Số lợn biểu hiện (n = 14)	Tỷ lệ (%)
1	Ủ rũ, mệt mỏi, lười vận động	13	92,86
2	Uống nhiều nước	8	57,14
3	Phân vàng hoặc trắng, có lẫn cặn sữa, có bọt khí	12	85,71
4	Nôn mửa	3	21,43
5	Lười bú, bỏ ăn, giảm ăn	12	85,71
6	Lợn hốc hác, gầy còm	12	85,71
7	Tiêu chảy	14	100

Nghiên cứu triệu chứng lâm sàng của lợn con tiêu chảy do Rotavirus, chúng tôi thấy bệnh diễn biến ở thể cấp tính. Triệu chứng lâm sàng của lợn thay đổi phụ thuộc vào lứa tuổi, trạng thái miễn dịch của lợn con, cũng như điều kiện quản lý chăm sóc của từng trại mà diễn biến lâm sàng của bệnh có thể giảm dần hoặc nghiêm trọng hơn và dẫn đến tử vong. Triệu chứng lâm sàng của bệnh bao gồm: ủ rũ, mệt mỏi, lười vận động, uống nhiều nước, tiêu chảy, phân vàng hoặc trắng có lẫn cặn sữa, có bọt khí, lười bú, bỏ ăn, giảm ăn, lợn hốc hác, gầy còm. Trong đó, triệu chứng lợn con ủ rũ, mệt mỏi, bỏ ăn, giảm ăn, gầy còm chiếm tỷ lệ 85,71-92,86% số con theo dõi.

Lợn tiêu chảy chiếm 100% tổng số con quan sát, do mất nước nhiều, con vật có biểu hiện khát nước và uống nhiều nước. Lợn uống nhiều nước chiếm 57,14%. Một số lợn con có biểu hiện nôn (21,43%).

Lợn con mắc bệnh làm cho quá trình hấp thu các chất bị cản trở, nhu động ruột tăng lên, khả năng tiêu hóa bị hạn chế, sữa và thức ăn thừa trong ruột non không được tiêu hóa, một thời gian chúng lên men yếm khí sinh hơi, do vậy phân của con vật có lẫn cặn sữa, có bọt khí. Lợn có phân vàng, hoặc trắng, có lẫn cặn sữa, có bọt khí chiếm 85,71%.

Rotavirus chịu được khoảng pH 3,0 - 9,0, nhờ đó chúng có khả năng chống chịu với pH thấp ở dạ dày (pH 2,5 - 3,5) và pH cao ở ruột non (6,0 - 7,5). Rotavirus tập trung chủ yếu ở lông nhung ruột non. Chúng tái tạo chủ yếu trong tế bào chất của tế bào biểu mô lông nhung ruột non (Buller và Moxley, 1988) và trong các tế bào biểu mô manh tràng hoặc đại tràng (Collins et al., 1989; Theil et al., 1978; Ward et al., 1996b), ở đây chúng phá hủy tế bào biểu mô trên bề mặt lông nhung. Kết quả là mọi hoạt động tiêu hóa, vận chuyển chất dinh dưỡng, chất điện giải của tế bào biểu mô trên bề mặt lông nhung bị đình trệ, giảm khả năng hấp thu chất dinh dưỡng. Nước và chất điện giải tích tụ trong lòng ruột cộng với chất dinh dưỡng hay sữa không được tiêu hóa làm tăng áp lực thẩm thấu trong lòng ruột. Áp lực này kéo nước trong mô bào vào lòng ruột càng làm dịch thể tích tụ trong xoang ruột, kích thích vào các thụ quan thần kinh cục bộ, tăng nhu động ruột sinh ra tiêu chảy làm cơ thể mệt mỏi dẫn đến chán ăn, bỏ ăn.

3.3. Xác định tổn thương đại thể trên lợn con tiêu chảy do Rotavirus

Tiến hành mổ khám trên lợn con bị tiêu chảy do Rotavirus (có kết quả xét nghiệm dương tính với Rotavirus bằng RT-PCR) để quan sát, kiểm tra bệnh tích đại thể và thu thập mẫu bệnh phẩm làm tiêu bản vi thể. Bệnh tích đại thể trên các cơ quan được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Các tổn thương đại thể ở lợn con tiêu chảy do Rotavirus (n=14)

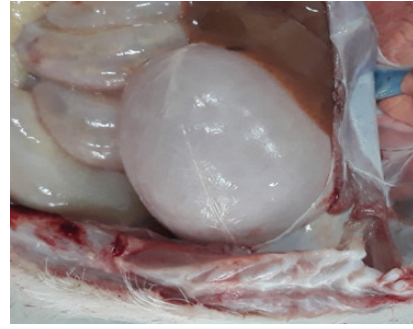
Bệnh tích	Số con biểu hiện	Tỷ lệ (%)
Có sữa trong dạ dày, ruột non	14	100
Hạch ruột sưng, thủy thũng	6	42,86
Thành ruột mỏng	11	78,57
Ruột non căng phồng	11	78,57
Viêm dạ dày-ruột	6	42,86
Niêm mạc ruột bị bào mòn, bong tróc	8	57,14

Quan sát các bệnh tích của lợn mổ khám, chúng tôi nhận thấy rằng bệnh tích chủ yếu tập trung ở ruột non, cụ thể hiện tượng có sữa trong dạ dày và ruột (100%), ruột non căng phồng, thành ruột mỏng

(78,57%) và niêm mạc ruột bị bong tróc, bị bào mòn (57,14%). Ngoài các bệnh tích kể trên, lợn con còn có hiện tượng hạch ruột sưng, thủy thũng và viêm dạ dày-ruột chiếm 42,86%.



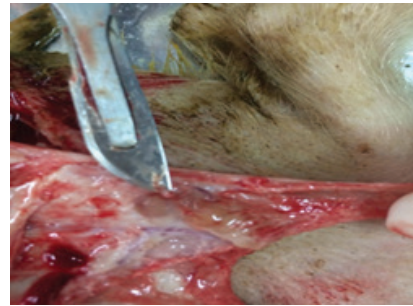
Hình 2. Lợn con bị tiêu chảy



Hình 3. Dạ dày căng phồng



Hình 4. Phổi viêm nhẹ



Hình 5. Hạch màng treo ruột sưng



Hình 6. Thận có vùng sung huyết



Hình 7. Thành ruột mỏng, căng phồng

Chúng tôi tiến hành so sánh với các bệnh khác gây tiêu chảy trên lợn con:

Theo bảng so sánh thì các bệnh gây tiêu chảy lợn do virus như PED, TGE và Rotavirus đều có triệu chứng, bệnh tích rất giống nhau nên trong thực tế lâm sàng dễ dàng chẩn đoán nhầm các bệnh với nhau. Vì vậy để phân biệt được các bệnh này cần phải dùng phương pháp chẩn đoán

trong phòng thí nghiệm như RT-PCR để xác định được nhanh và chính xác nguyên nhân gây bệnh và có biện pháp xử lý kịp thời giảm thiệt hại do bệnh gây ra trên đàn lợn.

Trên thực tế, lợn mắc Rotavirus bị nhiễm kế phát virus hoặc vi khuẩn thì bệnh trở nên trầm trọng và tỷ lệ chết tăng lên (Johannsen U., 1976).

TT	Tên bệnh	Tác nhân gây bệnh	Bệnh tích đại thể trên đường tiêu hóa	Tài liệu tham khảo
1	PED	Virus PED	Ruột căng phồng, đầy dịch màu vàng, chứa những cục sữa chưa tiêu. Thành ruột mỏng và trong suốt có thể do lỏng nhưng bị bào mòn, xuất huyết, chứa nhiều chất lỏng thối, hạch ruột sưng, thủy thũng, đặc biệt là ở không tràng và hồi tràng.	Nguyễn Tất Toàn và cs. (2012)
2	TGE	Virus TGE	Lợn tiêu chảy phân nhiều nước, phân màu vàng hoặc hơi xanh, lỏng nhớt, mùi khó chịu.	Nguyễn Như Thanh và cs. (2001)
3	Bệnh tiêu chảy do <i>E.coli</i>	Vi khuẩn <i>E.coli</i>	Lợn tiêu chảy phân có màu trắng, ruột bị sung huyết và xuất huyết.	
4	Phó thương hàn	Vi khuẩn <i>Salmonella</i>	Lợn tiêu chảy phân lỏng sống, màu vàng bột như cám hoặc màu xám, da xuất hiện những đám tụ máu, gan có những điểm hoại tử hoặc áp se	
5	Bệnh tiêu chảy do <i>Clostridium</i>	Vi khuẩn <i>Clostridium</i>	Lợn tiêu chảy ra máu, phân có lẫn bọt khí, có bệnh tích ở ruột non, xuất huyết máu đỏ tươi.	
6	Hồng lỵ	Vi khuẩn <i>Brachyspira</i>	Lợn tiêu chảy phân có lẫn máu tươi, màng niêm mạc và dịch nhầy do viêm ruột già, manh tràng, trực tràng.	

3.4. Xác định các tổn thương vi thể ở lợn con tiêu chảy do Rotavirus

Tất cả 14 cá thể lợn được xét nghiệm dương tính với Rotavirus, thu thập mẫu và bảo quản mẫu bệnh phẩm trong dung dịch formalin 10% trong thời gian 1 tuần để làm tiêu bản vi thể. Tiến hành đúc block, mỗi block được cắt, nhuộm tiêu bản, sau đó soi kính hiển vi đọc kết quả bệnh tích vi thể. Đánh giá bệnh tích vi thể: Nếu block có 2 tiêu bản có bệnh tích trở lên thì được coi là dương tính.

Tiêu hóa ở ruột non chiếm một vị trí vô cùng quan trọng trong việc hấp thu chất dinh dưỡng của cơ thể. Ruột non là nơi các chất dinh dưỡng của thức ăn được phân giải đến sản phẩm cuối cùng để cơ thể hấp thu dễ dàng. Ruột là cơ quan bị ảnh hưởng đầu tiên và là cơ quan bị tác động ngay khi Rotavirus xâm nhập. Chúng tôi đã đánh giá mức độ thương tổn trên các đoạn ruột do Rotavirus, kết quả được tổng hợp ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả tổn thương vi thể ở các đoạn ruột của lợn con tiêu chảy do Rotavirus

TT	Cơ quan	Tổn thương vi thể (n = 14)													
		Sung huyết		Xuất huyết		Hoại tử tế bào		Thoái hóa tế bào		Thâm nhiễm tế bào		Lông nhung bị ăn mòn		Tăng sinh các nang lympho	
		(+)	%	(+)	%	(+)	%	(+)	%	(+)	%	(+)	%	(+)	%
1	Tá tràng	9	64,2	8	57,1	3	21,4	14	100	14	100	13	92,8	13	92,8
2	Không tràng	13	92,8	6	42,8	10	71,4	14	100	14	100	14	100	14	100
3	Hồi tràng	6	42,8	5	35,7	8	57,1	13	92,8	12	85,8	9	64,2	10	71,4
4	Kết tràng	3	21,4	2	14,2	6	42,8	11	78,5	11	78,5	3	21,4	9	64,2

Ghi chú: n: số mẫu nghiên cứu; (+): số mẫu dương tính.

Qua bảng 4 nhận thấy sự biến đổi cấu trúc của ruột diễn ra mạnh nhất ở tá tràng và không tràng của ruột non, sự biến đổi sung huyết, thâm nhiễm tế bào viêm và lông nhung bị biến đổi xảy ra nhiều, chiếm tỷ lệ trên 80% số mẫu, vì không tràng là nơi diễn ra quá trình tiêu hóa hấp thu mạnh, đồng thời cũng là nơi dễ bị tổn thương.

Khi quan sát các tiêu bản vi thể ruột cho thấy tỷ lệ lông nhung bị teo dần ở tá tràng, không tràng là rất cao, lần lượt là 92,8% và 100%, còn hồi tràng và kết tràng có sự biến đổi cấu trúc lông nhung thấp hơn 21,4 – 64,2%. Bề mặt niêm mạc ruột non có nhiều “nếp gấp”. Trên những nếp nhăn lại có nhiều nhung mao (mỗi cm² có 2500 nhung mao) làm tăng bề mặt hấp thu của ruột non lên 20-25 lần. Diện tích tiếp xúc của nhung mao ở lợn là 28 m². Đoạn tá tràng của ruột non có nhiều nhung mao nhất so với các đoạn ruột khác. Càng về gần ruột già, số lượng lông nhung ruột càng giảm dần. Bề mặt các lông nhung được bao phủ bởi một lớp biểu mô mỏng.

Mỗi tế bào biểu mô lại có vô số vi nhung (3000 vi nhung trên một tế bào) làm tăng bề mặt hấp thu của lông nhung lên 30 lần, từ đó bề mặt hấp thu của ruột non tăng lên rất lớn (Trần Sáng Tạo, 2012). Như vậy, khi lợn con bị tiêu chảy do Rotavirus, ruột non có những tổn thương nghiêm trọng, đặc biệt ở lớp lông nhung và ảnh hưởng đến khả năng hấp thu chất dinh dưỡng, hậu quả có thể dẫn đến hiện tượng còi cọc, chậm lớn và thậm chí gây tử vong.

Quan sát dưới kính hiển vi, chúng tôi còn nhận thấy sự thâm nhiễm tế bào viêm ở mọi vị trí của ruột. Chúng tôi bắt gặp hiện tượng hoại tử tế bào, nhiều nhất ở phần không tràng (71,4%). Ngoài ra còn có hiện tượng tăng sinh tế bào lympho ở các đoạn ruột non (71,4 - 100%).

Bên cạnh nghiên cứu biến đổi vi thể của ruột thì chúng tôi còn nghiên cứu trên 14 mẫu ở các cơ quan hạch ruột, gan, phổi, thận. Kết quả được ghi lại ở bảng 5.

Bảng 5. Tổn thương vi thể ở một số cơ quan khác của lợn con tiêu chảy do Rotavirus

TT		Cơ quan	Tổn thương vi thể (n = 14)									
			Sung huyết		Xuất huyết		Hoại tử tế bào		Thoái hóa tế bào		Thâm nhiễm tế bào viêm	
			n (+)	%	n (+)	%	n (+)	%	n (+)	%	n (+)	%
1	Phổi	6	42,9	2	14,3	2	14,3	1	7,1	3	21,4	
2	Hạch ruột	10	71,4	3	21,4	1	7,1	3	21,4	5	35,7	
3	Gan	6	42,9	3	21,4	1	7,1	2	14,3	4	28,6	
4	Thận	5	35,7	4	28,6	2	14,3	1	7,1	2	14,3	

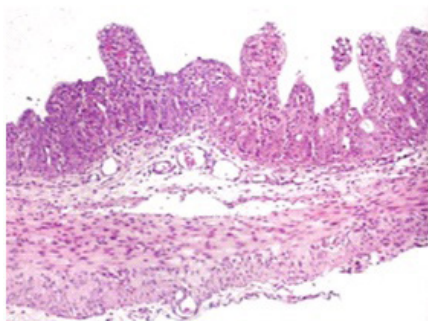
Ghi chú: n: số mẫu nghiên cứu, n (+): số mẫu dương tính.

Qua bảng 5, chúng tôi thấy tổn thương vi thể ở hạch ruột, gan, thận, phổi như sau:

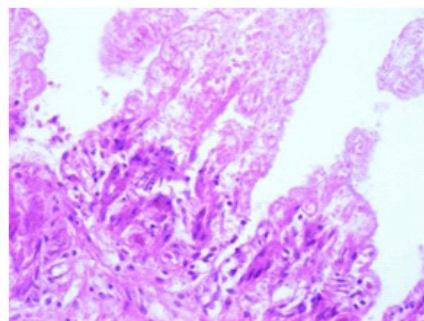
- Hạch ruột cũng như ruột, luôn là cơ quan chịu tác động tương đối sớm và bị ảnh hưởng lớn nhất, bên cạnh đó hạch còn tham gia vào các quá trình đáp ứng miễn dịch nên những biến đổi bệnh lý ở hạch ruột thường bị sớm hơn. Do vậy mà ở hạch ruột có quá trình biến đổi bệnh lý trầm trọng hơn, hiện

tượng sung huyết (71,4%), thoái hóa tế bào và thâm nhiễm tế bào viêm (chiếm 21,4-35,7%).

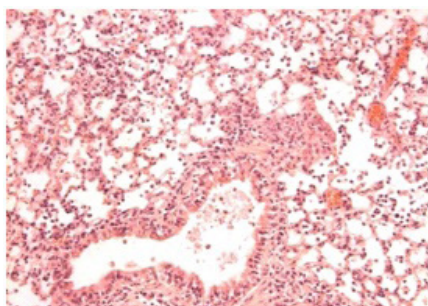
- Gan: tổn thương tập trung vào thoái hóa tế bào và thâm nhiễm tế bào viêm, hiện tượng thâm nhiễm tế bào viêm chiếm 28,6%, chủ yếu là các tế bào dạng lympho, tổ chức bào, đại thực bào và thoái hóa tế bào chiếm 14,3% .



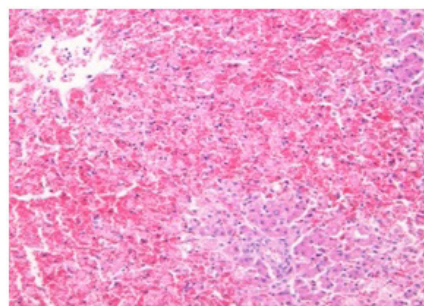
Hình 8. Niêm mạc ruột mỏng, các lông nhung ngắn và dính lại với nhau, HE, 100x



Hình 9. Ruột, một số lông nhung bị hoại tử phần đỉnh, HE, 400x



Hình 10. Phổi sung huyết và thâm nhiễm tế bào viêm, HE, 200x



Hình 11. Gan sung huyết, một số vùng có thâm nhiễm nhẹ bào lympho, HE, 200x

- Phổi: sung huyết chiếm 42,9%, thâm nhiễm tế bào viêm chiếm 21,4%.

- Thận: khác với gan, thâm nhiễm tế bào viêm chiếm 14,3%. Ở kẽ thận còn có biến đổi như xuất huyết chiếm 28,6%, mạch quản bị tổn thương nên gây hiện tượng sung huyết chiếm 35,7%, trên vi trường thấy mạch quản giãn rộng, trong lòng mạch quản chứa hồng cầu.

IV. KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu đã đạt được, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Đã phát hiện 16 mẫu/103 mẫu lợn con dương tính với Rotavirus, chiếm tỷ lệ 15,53%. Trong đó 14 mẫu chỉ dương tính với Rotavirus mà không đồng nhiễm tác nhân gây bệnh khác được thực hiện đánh giá mức độ thương tổn bệnh lý.

2. Triệu chứng lâm sàng lợn con tiêu chảy do

Rotavirus tập trung trên hệ tiêu hóa, nặng nhất là biểu hiện tiêu chảy chiếm 100%; phân vàng hoặc trắng có lẫn cặn sữa, có bọt khí chiếm 84% tổng số con theo dõi. Ngoài ra lợn mắc bệnh còn biểu hiện ủ rũ, mệt mỏi, lười vận động, uống nhiều nước, bỏ ăn, giảm ăn, lợn hốc hác và gây còm.

3. Tổn thương đại thể của lợn con tiêu chảy do Rotavirus chủ yếu xảy ra ở ruột non, thành ruột mỏng, căng ra, trong ruột chứa cặn sữa không tiêu (90-100%).

4. Tổn thương vi thể lợn con tiêu chảy do Rotavirus chủ yếu xảy ra ở đỉnh lông nhung làm lông nhung cùn, teo dần làm giảm khả năng tiêu hóa, hấp thu các chất dinh dưỡng của lợn con. Trên các đoạn ruột non, tổn thương vi thể nặng hơn trên đoạn tá tràng và không tràng với biểu hiện sung huyết, thâm nhiễm tế bào viêm và lông nhung bị ăn mòn ở hầu hết các mẫu nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Buller CR, Moxley RA., 1988. Natural infection of porcine ileal dome M cells with rotavirus and enteric adenovirus. *Vet Pathol* 25:516-517.
2. Collins JE, Benfield DA, Duimstra JR., 1989. Comparative virulence of two porcine group A rotavirus isolates in gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 50:827-835.
3. Collins P.J., Martella V., Buonavoglia C., O'Shea H., 2010. Identification of a G2-like porcine rotavirus bearing a novel VP4 type, P[32] *Veterinary Research*;41(5):73
4. Johannsen U., 1976. Pathology and pathogenesis of coli dysentery and coli diarrhea in suckling piglets, 2. Studies on the experimental induction of disease through the intragastric administration of coli-enterotoxin, *Arch Exp Veterinarmed*, 30(5), 709-25.
5. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RA., 2001. Rotaviruses, In Fields Virology. DM Kinipe, PM Howley, eds, Philadelphia: Lippincott-Raven and Wilkins Publishers, pp. 1787–1834.
6. Nguyễn Tất Toàn, Nguyễn Đình Quát, Trịnh Thị Thanh Huyền, Đỗ Tiến Duy, Trần Thị Dân, Nguyễn Thị Phước Ninh và Nguyễn Thị Thu, 2012. Phát hiện virus gây tiêu chảy cấp (PED) trên heo các tỉnh miền Đông Nam Bộ. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*. pp. 26-30.
7. Tuan Anh Nguyen, Pattara Khamrin, Quang Duy Trinh, Tung Gia Phan, Le Duc Pham, Le Phuc Hoang, Kim Trong Hoang, Fumihiko Yagyu, Shoko Okitsu, Hiroshi Ushijima, 2007. Sequence analysis of Viet Name P[6] rotavirus strains suggests evidence of interspecies transmission. *J. Medical Virology*. Vol 79.86-98.
8. Nguyễn Như Thanh, Nguyễn Bá Hiên, Trần Thị Lan Hương, 2001. Giáo trình vi sinh vật thú y. *Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội*.
9. Martel-Paradis O., Laurin M.-A., Martella V., Sohal J.S., L'Homme Y, 2013. Full-length genome analysis of G2, G9 and G11 porcine group A rotaviruses. *Veterinary Microbiology*. 62:94–102.
10. Lâm Thị Thu Hương và Đường Chi Mai, 2011. Tỷ lệ nhiễm Rotavirus và *Escherichia coli* K88 trên heo con tiêu chảy. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*. Tập XVIII - số 6, trang 15-26.
11. Pham Hong Anh, Juan J. Carrique-Mas, Nguyen Van Cuong, Ngo Thi Hoa, Nguyet Lam Anh, Do Tien Duy, Vo Be Hien, Phan Vu Tra My, Maia A. Rabaa, Jeremy Farrar, Stephen Baker and Juliet E. Bryant, 2014. The prevalence and genetic diversity of group A rotaviruses on pig farms in the Mekong Delta region of Viet Nam. *Vet Microbiol*. 170(3-4): 258–265.
12. Theil KW, Bohl EH, Cross RF, Kohler EM, Agnes AG., 1978. Pathogenesis of porcine rotaviral infection in experimentally inoculated gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 39:213-220.
13. Trần Sáng Tạo, 2012. Giáo trình sinh lý động vật, *Nhà xuất bản Đại học Huế*.
14. Ward LA, Rosen BI, Yuan L, Saif LJ., 1996. Pathogenesis of an attenuated and a virulent strain of group A human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *J Gen Virol* 77:1431-1441.

Ngày nhận 24-12-2018

Ngày phản biện 15-2-2019

Ngày đăng 1-5-2019

ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ MUỐI CAO VÀ PHƯƠNG THỨC NUÔI ĐẾN TỶ LỆ PHÂN LẬP, SỐ LƯỢNG VÀ TÍNH Mẫn CẢM KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* TRÊN GIỐNG VỊT BIỂN 15 ĐẠI XUYỀN

Tạ Phan Anh¹, Nguyễn Văn Duy¹,
Vương Lan Anh¹, Trần Thị Đức Tâm², Nguyễn Bá Tiếp²

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm xác định tỷ lệ phân lập, số lượng và mức độ mẫn cảm kháng sinh của *Escherichia coli* từ vịt biển 15 Đại Xuyên ở hai lứa tuổi vịt hậu bị và vịt đẻ nuôi trong hai môi trường nước ngọt và nước biển (nồng độ muối 3,2%). Kết quả nghiên cứu cho thấy trong môi trường nước ngọt, tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* phân lập được ở vịt hậu bị là cao hơn ở vịt đẻ. Không có sự khác biệt của tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* phân lập được giữa hai nhóm tuổi nuôi trong môi trường nước biển. Tỷ lệ *E. coli* phân lập được ở vịt nuôi ở môi trường nước biển là cao hơn so với vịt nuôi trong nước ngọt. Tuy nhiên, các chủng vi khuẩn phân lập từ vịt nuôi trong môi trường nước biển có mức độ mẫn cảm kháng sinh cao hơn so với các chủng vi khuẩn phân lập từ vịt nuôi trong môi trường nước ngọt. Đây là nghiên cứu đầu tiên về ảnh hưởng của nồng độ muối cao trong nước biển và phương thức nuôi đến tỷ lệ phân lập, số lượng và tính mẫn cảm kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* trên vịt biển 15 Đại Xuyên.

Từ khóa: Mẫn cảm kháng sinh, *Escherichia coli*, điều kiện nuôi, vịt biển 15 Đại Xuyên.

Effects of high salinity concentration and raising conditions to isolation rate, bacterial count and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* in sea duck 15 Dai Xuyen breed

Tạ Phan Anh, Nguyễn Văn Duy,
Vương Lan Anh, Trần Thị Đức Tâm, Nguyễn Bá Tiếp

SUMMARY

The objective of this study aimed at determining the isolation rate, bacterial count and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* in sea duck 15 Dai Xuyen breed. The studied result showed that in fresh water raising condition, the isolation rate of *E. coli* in the pre-layer ducks was higher than that of the layer ducks. The isolation rate of *E. coli* in the sea water raising ducks and fresh water raising ducks was not different. The total *E. coli* count in the sea water raising ducks was higher than that of the fresh water raising ducks. However, antibiotic susceptibility of *E. coli* isolated from the sea water raising ducks was higher than that of the fresh water raising ducks. This is the first study on the effects of high salinity concentration and raising conditions to the isolation rate, bacterial counts and antibiotic susceptibility of *E. coli* in sea duck 15 Dai Xuyen breed.

Keywords: Antibiotic susceptibility, *Escherichia coli*, raising conditions, sea duck 15 Dai Xuyen.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sinh kế của người dân vùng đất thấp, đặc biệt là vùng ven biển và hải đảo của Việt Nam chịu

những tác động của biến đổi khí hậu, đặc biệt là hiện tượng nhiễm mặn (Tran Tho Dat *et al.*, 2014). Giống vịt biển Đại Xuyên 15 (VB15) được chọn tạo và chính thức công nhận giống quốc gia vào năm 2014 là một trong những giải pháp chăn nuôi cho vấn đề này. Hiện nay, VB15 đang được

¹ Trung tâm nghiên cứu vịt Đại Xuyên

² Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

nuôi rộng rãi ở cả những vùng nước ngọt và nước mặn, gồm cả đảo Trường Sa. Cũng như các giống vịt khác, dù chưa có số liệu công bố, VB15 mắc một số bệnh phổ biến, trong đó có hội chứng tiêu chảy.

Vi khuẩn *E. coli* luôn là đối tượng được quan tâm trong hội chứng tiêu chảy. Các yếu tố môi trường, phương thức nuôi, giống và lứa tuổi vật nuôi đều có ảnh hưởng đến nguy cơ mắc bệnh và mức biểu hiện của bệnh. Với các loài chim biển, tỷ lệ phân lập *E. coli* phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó có yếu tố loài (Nelson *et al.*, 2008) và các yếu tố không gian, thời gian (Meays *et al.*, 2006). Nghiên cứu này nhằm mục đích làm rõ (1) nồng độ muối cao trong nước lợ và nước mặn có tác dụng hạn chế nhiễm vi khuẩn *E. coli* hay không, (2) phương thức nuôi bán hoang dã có tăng nguy cơ nhiễm khuẩn hay không và (3) mức độ miễn cảm kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ vịt nuôi trong các môi trường nước khác nhau về độ mặn. Kết quả này sẽ là cơ sở cho các biện pháp phòng và điều trị bệnh do *E. coli* trên giống vịt VB15.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Chuẩn bị vịt cho nghiên cứu

Nghiên cứu tiến hành trên 45 VB15 (25 vịt hậu bị và 20 vịt đẻ) nuôi tại Trung tâm nghiên cứu vịt Đại Xuyên (Phú Xuyên – Hà Nội). Vịt được nuôi bằng thức ăn công nghiệp hỗn hợp dạng đậm đặc hoặc dạng viên có bổ sung thóc luộc, thóc sống, ngô, rau tùy từng giai đoạn. Một số giai đoạn, vịt được bổ sung kháng sinh trong thức ăn gồm ampicillin, colistin, tetracycline, streptomycin, neomycin vào các giai đoạn được cho là có nguy cơ mắc bệnh cao: 1 đến 3 ngày, 18 đến 25 ngày, 28 đến 46 ngày, 70 đến 120 ngày, 180 đến 190 ngày và 2 tháng 1 lần sau khi đẻ.

Hai nhóm VB15 được nuôi trong đầm nước mặn tại huyện Tiên Lãng, thành phố Hải Phòng. Vịt được thả trong đầm, tự do tìm thức ăn và

được cho ăn thêm thóc hạt, ngô hạt và rau. Kháng sinh không được bổ sung vào bất kỳ giai đoạn nào.

Vật liệu: môi trường nuôi cấy, phân lập vi khuẩn *E. coli* do hãng Oxoid cung cấp gồm thạch máu, thạch MacConkey, thạch Muller Hinton, môi trường nước thịt thường, môi trường BHI. Hóa chất, nguyên liệu và dụng cụ thí nghiệm khác: thuốc nhuộm, giấy tẩm kháng sinh...

2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nội dung nghiên cứu

- Xác định tỷ lệ nhiễm *E. coli* của vịt VB15 giai đoạn hậu bị và vịt đẻ nuôi trong môi trường nước ngọt và nước biển

- So sánh số lượng *E. coli* trong mẫu phân của hai nhóm vịt VB15 nuôi trong hai môi trường nước ngọt và nước biển

- Đánh giá mức độ miễn cảm kháng sinh của các chủng *E. coli* phân lập từ vịt VB15 nuôi trong hai môi trường nước ngọt và nước biển.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Xác định độ mặn của nước

Mẫu nước được lấy tại vùng nuôi vịt cách bề mặt nước 0,5m. Sử dụng khúc xạ kế đo độ mặn MASTER-S28M (Salt Water), Atago®Japan. Các bước xác định nồng độ muối theo hướng dẫn sử dụng thiết bị của nhà cung cấp.

Phân lập và giám định vi khuẩn E. coli

Các mẫu phân của VB15 lấy từ ổ nhóp bằng tăm bông được bảo quản lạnh trong thùng bảo ôn và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Dịch mẫu sau xử lý được nuôi cấy trên các môi trường thạch máu, thạch MacConkey và môi trường nước thịt ở 37°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc điển hình tiếp tục được bồi dưỡng trên môi trường thạch máu và thạch MacConkey, nhuộm Gram, kiểm tra hình thái và giám định các đặc tính sinh hóa. Các chủng phân lập được giữ trong môi trường BHI/Glycerin ở -20°C.

Đánh giá tính miễn nhiễm kháng sinh

Sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (môi trường Mueller – Hinton Agar, MHA). Đĩa giấy có đường kính 6 mm được hấp tiệt trùng (121°C trong 15 phút) và sấy khô, sau đó đĩa giấy được tẩm kháng sinh. Tính miễn nhiễm kháng sinh của các chủng phân lập được đánh giá theo hướng dẫn của Viện tiêu chuẩn lâm sàng và phòng thí nghiệm (CLSI, 2008).

Phân tích số liệu

Sai khác có ý nghĩa được kiểm định bằng hàm "Khi" bình phương (Chi-square test).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả xác định độ mặn

Với khúc xạ kế MASTER-S28M, giá trị các lần đo độ mặn của nước khu vực nuôi vịt tại Trung tâm nghiên cứu vịt Đại Xuyên đều cho giá trị 0‰. Đây cũng là giá trị độ mặn của môi trường “nước ngọt”.

Kết quả xác định độ mặn của nước tại đầm nuôi thuộc huyện Tiên Lãng là 3,2‰. Theo Phạm

Sỹ Hoàn và cs. (2013), độ mặn của nước biển biến động và phụ thuộc vào nhiều yếu tố như vị trí địa lý, mùa trong năm, lượng mưa, nhiệt độ. Các tác giả cho thấy độ mặn tại vùng biển Vịnh Quy Nhơn biến động từ 1,1‰ đến 3,01‰ trong năm. Vũ Duy Vĩnh và cs. (2013) cho thấy độ mặn cao nhất của vùng ven biển châu thổ sông Hồng có thể tới 3,5‰. Như vậy, độ mặn tại thời điểm lấy mẫu nước khu vực nuôi là 3,2‰, trong khoảng biến động của độ mặn của nước vùng ven biển Việt Nam.

3.2. Tỷ lệ phân lập *E. coli* trên VB15 nuôi trong môi trường nước ngọt

Thực tế chăn nuôi cho thấy vịt con có nguy cơ mắc bệnh cao, đặc biệt là bệnh do *E. coli*. Tại Trung tâm nghiên cứu vịt Đại Xuyên, điều trị bệnh do *E. coli* rất khó khăn, dẫn đến tăng tỷ lệ hao hụt của đàn. Xác định tỷ lệ nhiễm *E. coli* trên VB15 ở các lứa tuổi khác nhau là cơ sở cho các biện pháp phòng bệnh. Kết quả phân lập *E. coli* ở 2 lứa tuổi của vịt tại Trung tâm được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân lập *E. coli* trên VB15 nuôi trong môi trường nước ngọt

Lứa tuổi	Số mẫu	Kết quả phân lập vi khuẩn	
		Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Vịt hậu bị	20	18	90,0
Vịt đẻ	25	17	68,0
Tổng hợp	45	35	77,8

Adzitey *et al.* (2012) phân lập *E. coli* từ 150 mẫu phân, chất chứa ruột, mẫu đất và nước từ vịt khỏe và môi trường nuôi cho tỷ lệ dương tính 78%, trong đó mẫu tắm bông từ ổ nhóp có tỷ lệ phân lập cao nhất (87,9%). Nhóm nghiên cứu của Avishek *et al.* (2012) cũng cho thấy tỷ lệ phân lập *E. coli* trong 60 mẫu tắm bông từ ổ nhóp vịt tại Nepal và 60 mẫu tại Bangladesh cho kết quả tương ứng là

66,7% và 75%. Nghiên cứu phân lập *E. coli* từ vịt chạy đồng (Lê Văn Đông, 2011) cho thấy tỷ lệ phân lập *E. coli* tại Trà Vinh ở 3 lứa tuổi vịt con, vịt hậu bị và vịt đẻ tương ứng là 60,14%; 25,2% và 14,67%. Như vậy, tỷ lệ phân lập *E. coli* từ VB15 ở mức cao, tương tự như tỷ lệ phân lập tại Nepal và Bangladesh. Các cơ sở nuôi VB15 cần lưu ý đến những vấn đề này.

Trong nghiên cứu này, VB15 hậu bị có tỷ lệ phân lập *E. coli* cao hơn VB15 đang sinh sản ($P < 0,05$). Đây cũng là giai đoạn ảnh hưởng đến chất lượng đàn vịt đẻ.

3.3. Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm *E. coli* trên VB15 nuôi trong môi trường nước mặn

Đưa VB15 nuôi ở môi trường nước mặn là

một bước đột phá của ngành chăn nuôi trong giai đoạn có nguy cơ chịu tác động của biến đổi khí hậu. Vì vậy, việc xác định sự có mặt của vi khuẩn *E. coli* ở 2 lứa tuổi trên VB15 trong điều kiện nuôi này rất cần thiết, là cơ sở định hướng phòng bệnh cho đàn. Kết quả phân lập được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phân lập *E. coli* trên VB15 nuôi trong môi trường nước mặn

Lứa tuổi	Số mẫu	Kết quả phân lập vi khuẩn	
		Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Vịt hậu bị	15	14	93,3
Vịt đẻ	15	13	86,7
Tổng hợp	30	27	90,0

Kết quả cho thấy tỷ lệ phân lập ở giai đoạn vịt hậu bị là 93,3% và vịt đẻ là 86,7%. Tỷ lệ nhiễm trung bình của vịt ở 2 lứa tuổi là 90,0%. Không có sai khác về tỷ lệ phân lập của hai nhóm mẫu phân từ vịt ở hai lứa tuổi. Như vậy, trong môi trường nước ngọt, tỷ lệ phân lập *E. coli* ở vịt hậu bị cao hơn ở vịt đẻ, nhưng ảnh hưởng này không còn khi vịt được chuyển nuôi trong môi trường nước biển. Nếu tính chung cho cả hai lứa tuổi, VB15 trong môi trường nước mặn có tỷ lệ phân lập *E. coli* cao hơn ở vịt nuôi trong môi trường nước ngọt (tương ứng là 90,0% và 77,8%). Đây có thể là kết quả gây ngạc nhiên vì một số ý kiến cho rằng nước mặn làm giảm tỷ lệ nhiễm khuẩn và giảm nguy cơ mắc bệnh do vi khuẩn.

Nghiên cứu của Abdulkarim *et al.* (2009) cho thấy trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn, nếu tăng nồng độ muối dưới ngưỡng gây độc, có thể kích thích khuẩn lạc *E. coli*. Tuy nhiên, đây là nghiên cứu với nồng độ muối thấp hơn rất nhiều so với nồng độ muối quyết định độ mặn của nước biển. Vậy nồng độ muối cao trong nước biển đã làm tăng tỷ lệ nhiễm? Với nồng độ muối của nước biển, câu trả lời đó chưa

thuyết phục. Trở lại với quy trình nuôi, có thể nhận thấy VB15 nuôi bán hoang dã trong môi trường nước mặn không được bổ sung bất kỳ loại kháng sinh nào trong tất cả các giai đoạn, từ úm đến sinh sản. Bổ sung kháng sinh cho VB15 nuôi trong nước ngọt có thể là nguyên nhân làm tỷ lệ phân lập từ nhóm vịt này thấp hơn nhóm nuôi trong nước mặn.

3.4. Kết quả xác định tổng số *E. coli* trong mẫu phân VB15

Để đánh giá ảnh hưởng của môi trường nước đến mức độ nhiễm *E. coli* ở VB15, tổng số vi khuẩn *E. coli* trong phân đã được xác định. Tổng số 12 mẫu phân (6 mẫu từ VB15 nuôi trong mỗi môi trường nước) được xác định chỉ tiêu tổng số *E. coli*.

Như vậy, VB15 nuôi trong môi trường nước mặn có tổng số vi khuẩn *E. coli*/g phân cao hơn nhiều của vịt trong môi trường nước ngọt. Điều này trái với suy đoán ban đầu là khi đưa vịt ra môi trường nước mặn thì tổng số vi khuẩn *E. coli*/g phân vịt sẽ giảm.

Bảng 3. Tổng số vi khuẩn *E. coli* trong phân VB15

Mẫu	Tổng số vi khuẩn <i>E. coli</i> /g phân	
	Mẫu phân vệt nước ngọt	Mẫu phân vệt nước mặn
1	2×10^8	21×10^8
2	7×10^8	29×10^8
3	5×10^8	31×10^8
4	$2,5 \times 10^8$	35×10^8
5	$3,8 \times 10^8$	40×10^8
6	$2,4 \times 10^8$	23×10^8

3.5. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* phân lập được

Lựa chọn kháng sinh thích hợp có tác dụng điều trị cần dựa trên nhiều yếu tố, trong đó có khả năng kháng của vi khuẩn gây bệnh. Tính kháng kháng sinh của vi khuẩn phụ thuộc vào loại kháng sinh, vật chủ mắc bệnh, cách dùng thuốc và đặc biệt là tần số và thời gian vi khuẩn chịu tác động của kháng sinh. Chưa có đánh

giá miễn cảm kháng sinh của *E. coli* phân lập từ VB15. Nghiên cứu này đã xác định tính miễn cảm và khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được với 14 loại kháng sinh. Các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ 35 vệt nuôi trong môi trường nước ngọt và 27 vệt nuôi trong môi trường nước mặn được đánh giá miễn cảm kháng sinh. Số chủng *E. coli* được đánh giá là 150 (75 chủng cho mỗi nhóm vệt). Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Khả năng kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* phân lập

Kháng sinh	<i>E. coli</i> từ VB15 nước mặn (75 chủng)		<i>E. coli</i> từ VB15 nước ngọt (75 chủng)	
	Số chủng kháng	Tỷ lệ (%)	Số chủng kháng	Tỷ lệ (%)
Amoxicillin/ Clavulanic acid	0	0	0	0
Ampicillin	75	100	75	100
Flumequin	75	100	75	100
Doxycyclin	40	53	75	100
Colistin	38	51	63	84
Ceftiofur	62	83	75	100
Gentamycin	25	33	43	57
Norfloxacin	75	100	75	100
Oxytetracyclin	75	100	75	100
Tylosin	35	47	36	48
Tilmicosin	60	80	75	100
Tetracyclin	55	73	75	100
Lincomycin + Spectinomycin	48	64	75	100
Sulphamethoxazole + trimethoprim	53	71	69	92

Rất ít chủng *E. coli* phân lập mẫn cảm với 14 loại kháng sinh, cho thấy hầu hết các chủng *E. coli* đã có khả năng kháng một số loại kháng sinh. Tất cả các chủng *E. coli* phân lập từ phân VB15 nước ngọt kháng 9/14 kháng sinh được kiểm tra. Với tổ hợp trimethoprim+sulfamethoxazole, có 92% số chủng kháng. Tỷ lệ kháng colistin, gentamycin và tylosin tương ứng là 84%, 57% và 48%. Trong khi đó, amoxicillin (kháng sinh thuộc nhóm β -lactam) cho tỷ lệ mẫn cảm cao (100%). Đây là một trong những điều đáng lo ngại.

Nguyễn Thị Liên Hương và cs. (2010) đã kiểm tra tính mẫn cảm của 58 chủng *E. coli* phân lập từ nạng bệnh với 13 loại kháng sinh cho thấy tỷ lệ mẫn cảm rất thấp. Các chủng *E. coli* đã kháng hoàn toàn tetracyclin và ceftriaxon (100%), tiếp đến là streptomycin và apramycin (96,6%), sulfamethoxazole/ trimethoprim (82,8%). Theo Võ Trà An và cs. (2010) và Lê Văn Đông (2010), các chủng *E. coli* kiểm tra mẫn cảm cao với amikacin (97,92% số chủng), tiếp đến là colistin (91,67%), fosfomycin (85,42%) và ampi+sulbactam (83,33%). Vi khuẩn *E. coli* kháng 11 trong 12 loại kháng sinh thông dụng, tỷ lệ kháng từ 2,08-68,75%. Qua các nghiên cứu trong nước cho thấy *E. coli* phân lập từ các động vật khác nhau ở các địa phương tăng dần mức kháng thuốc theo thời gian phân lập, các năm gần đây cao hơn các năm trước. Vi khuẩn *E. coli* ngày càng kháng nhiều loại kháng sinh. Cơ chế kháng kháng sinh của vi khuẩn theo cơ chế truyền dọc, truyền ngang, làm tăng các gen kháng thuốc. *E. coli* cũng đã được Zinnah *et al.* (2008) chứng minh có thể kháng nhiều nhóm kháng sinh, 90% các chủng *E. coli* đã kháng với 3 loại kháng sinh thuộc 3 nhóm khác nhau gồm ampicillin (nhóm β -lactam), tetracyclin (nhóm tetracyclines) và erythromycin (nhóm macrolides). Theo Avishek *et al.* (2013), các chủng *E. coli* phân lập từ vịt ở Nepal và Bangladesh rất mẫn cảm với chloramphenicol, amoxycillin và cephalixin (100%). Đặc biệt,

các chủng *E. coli* từ Nepal mẫn cảm cao với cotrimoxazole. Tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* trung bình là 50%, thấp hơn trong nghiên cứu này. Adzitey *et al.* (2013) đánh giá mẫn cảm kháng sinh của 55 chủng *E. coli* phân lập từ vịt ở Penang và Malaysia cho thấy 100% đã kháng vancomycin, 92,7% kháng tetracyclin, tiếp đến là ampicillin (72,7%), streptomycin và sulfamethoxazole - trimethoprim (67,3%). Vi khuẩn *E. coli* nhạy cảm nhất với nitrofurantoin (61,8%), tiếp đến là ofloxacin và gentamycin (52,7%). Như vậy, các nghiên cứu của nước ngoài cũng cho thấy tỷ lệ kháng thuốc cao của *E. coli* phân lập từ vịt.

Vịt nuôi trong môi trường nước ngọt trong nghiên cứu này vẫn được bổ sung kháng sinh vào những giai đoạn có nguy cơ cao nhằm mục đích phòng bệnh. Hơn nữa, trong nhiều thời điểm, vịt mắc các bệnh khác nhau, trong đó có những bệnh phải điều trị bằng kháng sinh. Đây có thể là một trong những nguyên nhân xuất hiện *E. coli* có khả năng kháng thuốc. Tại trang trại VB15 nước mặn, vịt được nuôi bán hoang dã, tự do kiếm ăn trong môi trường nước có độ mặn 3,2‰. Đây có thể là nguyên nhân chính dẫn đến tỷ lệ phân lập được vi khuẩn *E. coli* từ các mẫu phân của nhóm vịt này cao hơn của vịt nuôi trong môi trường nước ngọt. Tuy nhiên, tỷ lệ các chủng *E. coli* từ vịt “nước mặn” mẫn cảm với kháng sinh cao hơn, đồng nghĩa với khả năng kháng kháng sinh thấp hơn. Đây là một ví dụ điển hình về mối quan hệ giữa các yếu tố môi trường nuôi - quy trình nuôi - vi khuẩn gây bệnh - đặc điểm sinh học của vi khuẩn gây bệnh. Kết quả này gợi ý cho những nghiên cứu tiếp theo về mối quan hệ lý thú này.

IV. KẾT LUẬN

Tỷ lệ phân lập vi khuẩn *E. coli* từ VB15 nuôi trong môi trường nước ngọt khác nhau giữa hai nhóm tuổi, nhóm vịt hậu bị có tỷ lệ phân lập cao hơn nhóm vịt đẻ. Trong môi trường nước biển, sự khác biệt này không còn.

Tổng số vi khuẩn *E. coli* từ các mẫu phân VB15 nuôi trong môi trường nước biển cao hơn từ nhóm nuôi trong môi trường nước ngọt. Ngược lại, tỷ lệ các chủng *E. coli* phân lập từ VB15 nuôi trong môi trường nước biển miễn cảm với kháng sinh cao hơn so với các chủng *E. coli* phân lập từ VB15 nuôi trong môi trường nước ngọt.

Tóm lại, độ mặn của nước và quy trình nuôi ảnh hưởng đến tỷ lệ phân lập vi khuẩn *E. coli* và mức độ kháng kháng sinh của vi khuẩn này trên vịt biển 15 Đại Xuyên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdulkarim S.M., Fatimah A.B., Anderson J.G. (2009). Effect of salt concentrations on the growth of heat-stressed and unstressed *Escherichia coli*. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.7 (3&4), 51-54.
2. Adzitey, F., Ali, G.R.R., Huda, N. and Ting, S.L. (2013). Antibiotic resistance and plasmid profile of *Escherichia coli* isolated from ducks in Penang, Malaysia., *International Food Research Journal*, 20(3): 1473-1478.
3. Avishek, S., Shahidu Rahman Khan, Md., Sukumar, S., Jayedul, H. and Urmi, R. (2012). Isolation and Detection of Antibiotic Sensitivity Pattern of *Escherichia coli* from Ducks in Bangladesh and Nepal, *Microbes and Health*, 1(1):6-8.
4. Brenhorvd O., Kapperud G., Langeland G. (1992). Survey of thermotolerant *Campylobacter* spp and *Yersinia* spp in three surface water sources in Norway. *Int. J. Food Microbiol.* 15:327-338.
5. Lê Văn Đông (2011). Tình hình nhiễm và sự nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* gây bệnh trên đàn vịt chạy đồng tại tỉnh Trà Vinh, *Khoa học công nghệ*, (1): 33-41.
6. Meays C.L., Broersma K., Nordin R., Mazumder A., Samadpour M. (2006). Spatial and annual variability in concentrations and sources of *Escherichia coli* in multiple watersheds. *Environ Sci Technol* 40, 5289–5296.
7. Nelson M, Jones S.H., Edwards C, Ellis J.C. (2008). Characterization of *Escherichia coli* populations from gulls, landfill trash, and wastewater using ribotyping. *Dis Aquat Org Dis Aquat Org* 81: 53–63.
8. Nguyễn Thị Liên Hương, Đỗ Ngọc Thúy và Lê Thị Minh Hằng (2010). Kết quả gây nhiễm thử nghiệm một số chủng vi khuẩn *E. coli* gây bệnh cho ngan trên phôi trứng. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, 17(2): 58-59.
9. Phạm Sĩ Hoàn, Nguyễn Chí Công, Lê Đình Mẫu (2013). Đặc điểm khí tượng, thủy văn và động lực vùng biển vịnh Quy Nhơn. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển* 13(1) 1-11
10. Tran Tho Dat; Vu Thi Hoai Thu; Pham Ngoc Toan (2014). Vulnerability and Adaptation of Coastal Livelihoods to the Impacts of Climate Change: A Case Study in Coastal Districts of Nam Dinh, Viet Nam. *JED*, 16(2), 39-60.
11. Võ Thị Trà An, Nguyễn Thanh Tùng, Nguyễn Ngọc Tuấn, Văn Bích và Nguyễn Sử Minh Tuyết (2014). Đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ người và heo. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*, 56-62.
12. Vũ Duy Vĩnh, Katrijn Baetens, Patrick Luyten, Trần Anh Tú, Nguyễn Thị Kim Anh (2013). Ảnh hưởng của gió bề mặt đến phân bố độ mặn và hoàn lưu vùng ven bờ châu thổ sông Hồng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Biển* 13(1) 12-20.

Ngày nhận 21-12-2018

Ngày phản biện 11-1-2019

Ngày đăng 1-5-2019

ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA GEN KHÁNG KHÁNG SINH Ở VI KHUẨN *VIBRIO CHOLERA* PHÂN LẬP TẠI TỈNH TRÀ VINH

Nguyễn Thị Dấu¹, Hồ Thị Việt Thu²

TÓM TẮT

Trong số 25 chủng *Vibrio* spp. phân lập được từ các loại mẫu nước sông, nước biển, thức ăn có nguồn gốc thủy sản tại tỉnh Trà Vinh vào tháng 12 năm 2014, có 6 chủng được định danh là *Vibrio cholerae* và được xác định tính nhạy cảm đối với 8 loại kháng sinh. Bằng phương pháp Kirby-Bauer (CLSI, 2010), đã xác định được các chủng đề kháng kháng sinh bao gồm: streptomycin (50%), ampicillin (17%), tetracycline (33%), trimethoprim-sulfamethoxazole (33%) và vancomycin (67%). Bằng phương pháp PCR, đã phát hiện được 2 chủng *Vibrio cholerae* trong tổng số 6 chủng kiểm tra chứa gen kháng kháng sinh *tetA*, gen mã hóa kháng tetracycline, các nhóm gen *blaSHV*, *aac(3)-IV* và *dhfrI* mã hoá đề kháng với kháng sinh β -Lactam, Aminoglycosid, Trimethoprim đã không phát hiện được ở nghiên cứu này.

Trình tự nucleotide đoạn gen của 2 chủng *Vibrio cholerae* trong nghiên cứu này so sánh với các chủng phân lập được tại Thái Lan, Nhật Bản, Trung Quốc, Indonesia, Brazil và Ấn Độ cho thấy mức độ tương đồng là 97% với 10 chủng; tương đồng 96% với 1 chủng và tương đồng 94% với 2 chủng. Cây phả hệ về chủng loài cũng chứng tỏ mối quan hệ gần của những chủng mang gen kháng kháng sinh luôn có nguy cơ tiềm ẩn, dễ dàng thu nhận và lây truyền các gen kháng từ các yếu tố di truyền như plasmid, integrons, transposons (gen nhảy). Đột biến gen kháng thuốc của vi khuẩn *V. cholerae* luôn hiện diện ngoài môi trường và trong thức ăn có nguồn gốc từ hải sản.

Từ khoá: *Vibrio cholerae*, gen kháng kháng sinh, trình tự tương đồng, Trà Vinh.

Genetic characteristics of antibiotic resistance genes in *Vibrio cholerae* isolated in Tra Vinh province

Nguyễn Thị Dấu, Hồ Thị Việt Thu

SUMMARY

Out of 25 *Vibrio* spp. strains isolated from the river, sea water and feed having origin from fish in Tra Vinh province in December, 2014, there were 6 strains classified as *Vibrio cholerae* strains and they were tested for antibiotic resistance with 8 antibiotics. By Kirby-Bauer method, the antibiotic resistance strains were determined, including 50% of the strains were resistant to streptomycin, 17% were resistant to ampicillin, 33% were resistant to tetracycline, 33% were resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole and 67% were resistant to vancomycin. The PCR analysis results also showed that there were 2 out of 6 *Vibrio cholerae* strains containing antibiotic resistance *tetA* gene encoding for tetracycline resistance, the antibiotic resistance gene groups (*blaSHV*, *aac(3)-IV* and *dhfrI*) encoding for resistance to antibiotics: β -lactam, aminoglycosid, trimethoprim were not detected in this study.

The nucleotide sequence similarity level of the *TestAF* and *TestAR* genes of the isolated strains in this study in comparison with those of the other isolated strains in Thailand, Japan, China, Indonesia, Brazil and India was 97% with 10 strains; 96% with 01 strains and 94% with 02 strains. The result of phylogenetic tree analysis also showed close relationship of the strains carrying antibiotic resistance genes are always potential risks, easy to receive and transfer the antibiotic resistance genes from genetic factors, such as: plasmids, integrons, transposons. The antibiotic resistance mutation genes in *V. cholerae*, are always present in the environment and seafood.

Keywords: *Vibrio cholerae*, antibiotic resistance gene, homological sequence, Tra Vinh.

¹ Trường Đại học Trà Vinh

² Đại học Cần Thơ

I. GIỚI THIỆU

Vibrio cholerae là vi khuẩn Gram âm, tác nhân của bệnh dịch tả trên người, gây tiêu chảy cấp tính và mất nước, dịch bệnh xảy ra với các hình thức dịch địa phương và đại dịch. *V. cholerae* đã được phân loại hơn 200 nhóm huyết thanh. Trong số này, chỉ có nhóm huyết thanh O1 và O139 là gây dịch bệnh (Kaper, 1995; Faruque, 1998). Có nhiều loại kháng sinh sử dụng không còn hoặc ít tác dụng với vi khuẩn này, trong đó có *V. cholerae*, đang là vấn đề phức tạp trong điều trị bệnh và là mối quan tâm đối với sức khỏe cộng đồng. Nhiễm sắc thể được chứng minh là yếu tố di truyền gen kháng thuốc của vi khuẩn (Ghosh et al., 2011). Việc thu nhận và lây truyền các gen kháng kháng sinh giữa các loài vi khuẩn trong môi trường là do các yếu tố di truyền như plasmid, integrons và transposons (gen nhảy) (Ghosh et al., 2011).

Thực phẩm và nước ô nhiễm vi khuẩn kháng kháng sinh là một mối đe dọa lớn đối với sức khỏe cộng đồng. Bên cạnh đó, thuốc kháng sinh thường được bổ sung vào thức ăn cho động vật đã góp phần làm tăng nguy cơ kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh trên người (Smith et al., 1999), điều này có thể khẳng định trong thực tế hiện tượng kháng kháng sinh đang gia tăng cả trong lĩnh vực chăn nuôi và y tế công cộng (Teuber, 2001; Bywater, 2004).

Đề cập nhất về hiện trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn *V. cholerae* phân lập từ môi trường và thức ăn hải sản, đặc biệt là ở vùng đồng bằng sông Cửu Long, nơi có nhiều điều kiện để vi khuẩn lây lan như có nhiều sông ngòi, nơi phát triển nghề nuôi nghêu và tôm, cùng với mục tiêu nhằm xác định mối liên quan về đặc điểm di truyền của gen kháng kháng sinh ở *V. cholerae* phân lập trên môi trường nước và trên mẫu nghêu, chúng tôi đã tiến hành xác định đặc điểm di truyền của

gen kháng kháng sinh, từ đó xác định tính tương đồng của gen kháng kháng sinh của *V. cholerae* phân lập được tại tỉnh Trà Vinh với những chủng *V. cholerae* phân lập từ môi trường, thức ăn hải sản ở Việt Nam và trên thế giới.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Phương pháp xác định sự đề kháng kháng sinh

Hai mươi lăm chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. phân lập được từ các loại mẫu nước sông, nước biển, thức ăn có nguồn gốc thủy sản tại tỉnh Trà Vinh trong tháng 12 năm 2014. Môi trường chuyên biệt dùng nuôi cấy, phân lập vi khuẩn *Vibrio* như Alkaline peptone water (APW: 400086-Mumbai, India), Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS: 64271 Darmstadt, Germany), Saline Nutrient Agar (SNA: 64271 Darmstadt, Germany); bộ định danh vi khuẩn Gram âm với bộ test IDS 14GNR (Nam Khoa).

Phương pháp nuôi cấy, kiểm tra đặc tính sinh hoá để phát hiện và phân biệt các loài *Vibrio* được thực hiện theo quy trình ISO/TS 21872-2:2009 (E). Kiểm tra tính mẫn cảm kháng sinh theo phương pháp chuẩn (CLSI, 2010: Clinical and Laboratory Standards Institute) với môi trường thạch Mueller-Hinton (MHA). Chọn 8 loại kháng sinh thường dùng trong điều trị bệnh tả do *Vibrio*: streptomycin (10µg), norfloxacin (10µg), ampicillin (10µg), tetracycline (30µg), azithromycin (30µg), amoxicillin-clavulanic acid (30µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (25µg) và vancomycin (30µg).

Phương pháp PCR được thực hiện với các cặp mồi tương ứng với gen kháng kháng sinh *bla_{SHV}*, *aac(3)-IV*, *tetA* và *dhfrI*, (bảng 1) (Maynard et al., 2003) và giải trình tự tìm đoạn gen tương đồng trên Genbank bằng chương trình BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).

Bảng 1. Trình tự nucleotid các cặp môi trong phản ứng PCR xác định gen kháng kháng sinh

Nhóm kháng sinh	Môi	Trình tự nucleotide của môi (5' → 3') Môi xuôi / Môi ngược	Độ dài (bp)
β-Lactam	<i>bla_{SHV}</i>	TCGCCTGTGTATTATCTCCC CGCAGATAAATCACCACAATG	768
Aminoglycosid	<i>aac(3)-IV</i>	GTGTGCTGCTGGTCCACAGC AGTTGACCCAGGGCTGTCGC	286
Tetracycline	<i>tetA</i>	GTGAAACCC AACATACCCC GAAGGCAAGCAGGATGTAG	888
Trimethoprim	<i>dhfrI</i>	AAGAATGGAGTTATCGGGAATG GGGTAAAACTGGCCTAAATTG	931

(Nguồn: Maynard et al., 2003)

2.2. Phương pháp giải trình tự

2.2.1. Quy trình tách chiết DNA từ khuẩn lạc

Chọn 10 khuẩn lạc trên môi trường thạch không chọn lọc (SNA: saline nutrient agar), cho vào tube chứa 2,2 ml có sẵn bi sắt vô trùng và lắc đều bằng máy vortex, sau đó thêm 1 ml dung dịch Lysis buffer, lắc đều, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút, dùng pipette tách phần dung dịch (400 µl) chuyển sang tube mới. Cho một lượng tương đương Ethanol 95%, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút, bỏ phần nước trong phía trên. Kết tủa được rửa bằng Ethanol 70% trong 500 µl, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Sấy khô phần tủa (DNA) trong 10 phút ở 45°C; sau đó hòa tan DNA thu được trong 100 µl TE 0.1X và trữ ở -20°C.

2.2.2. Phát hiện gen kháng kháng sinh bằng kỹ thuật PCR

Các gen kháng kháng sinh định hướng phát hiện bao gồm *bla_{SHV}*, *aac(3)-IV*, *tetA* và *dhfrI* với 4 cặp môi tương ứng có trình tự nucleotid được trình bày trong bảng 1 (Maynard et al., 2003). Thành phần 1 phản ứng PCR bao gồm: DNA tổng số khoảng 25µl; 2,5µl buffer 1X (Tris 10 mM, KCl 50 mM, pH 9.0, Triton X-100), 2µl MgCl₂, 4µl cho mỗi dNTP, 1µl mỗi xuôi và 1µl mỗi ngược, 0,25µl Taq DNA polymerase. Chu

kỳ nhiệt của phản ứng PCR như sau: 95°C trong 10 phút, sau đó lặp lại 30 chu kỳ với các bước như sau: Biến tính ở 95°C trong 1 phút, gắn môi ở 53°C trong 1 phút, tổng hợp DNA ở 72°C trong 1 phút. Cuối cùng phản ứng được duy trì ở 72°C trong 10 phút.

Sản phẩm PCR được phân tích trên gel agarose 1,5% trong dung dịch đệm TBE 1X ở 100V trong 90 phút và chụp bằng máy chụp hình gel Biorad UV 2000, thang chuẩn 100 bp. (công ty Fermentas).

2.2.3. Phân tích trình tự gen và thiết lập cây phả hệ

Sản phẩm PCR (DNA) được gửi giải trình tự tại công ty Macrogen Inc (Hàn Quốc). Các trình tự được phân tích và đọc bằng phần mềm BioEdit, sau đó so sánh với các trình tự nucleotid tương đồng trên Genbank và suy diễn với trình tự nucleotid tương ứng bằng chương trình BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/), từ đó thiết lập cây phát sinh loài, sử dụng phương pháp Neighbor-joining, ký hiệu Gen-DKKS-T1-TraVinhVN-2014 và Gen-DKKS-T3-TraVinhVN-2014, quan sát cây phát sinh loài bằng phần mềm Treeview.

Các chủng vi khuẩn sử dụng trong so sánh và thiết lập cây phát sinh loài trong nghiên cứu này được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Các chủng vi khuẩn sử dụng so sánh và phân tích với trình tự các chủng *Vibrio cholerae*: Gen DKKS-T1-TraVinhVN-2014 và gen DKKS-T3-TraVinhVN-2014

Chủng vi khuẩn <i>Vibrio cholerae</i>	Nơi phân lập	Năm phân lập	Mẫu phân lập	Mã số Genbank
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1 vcmD	Japan	2005		AB213657.1
<i>Vibrio cholerae</i> O395 chromosome I	China	2008	Nước	CP001235.1
<i>Vibrio cholerae</i> LMA3894-4 chromosome	Brazil	2011	Nước	CP002555.1
<i>Vibrio cholerae</i> MS6 DNA	Thailand	2014	Phân bệnh nhân	AP014524.1
<i>Vibrio cholerae</i> M66-2 chromosome I	Indonesia	2008		CP001233.1
<i>Vibrio cholerae</i> IEC224 chromosome I,	"Brazil: Belem"	2012		CP003330.1
<i>Vibrio cholerae</i> O1 str. 2010EL-1786	Haïti	2010	Nước	CP003069.1
<i>Vibrio cholerae</i> MJ-1236 chromosome 1	Bangladesh	2009		CP001485.1
<i>Vibrio fluvialis</i> MATE-AshVFD69	India	2007	Phân bệnh nhân	EU263361.1
<i>Vibrio fluvialis</i> MATE -AshVFD53	India	2007	Phân bệnh nhân	EU263360.1
<i>Vibrio cholerae</i> clone FLH214558	USA	2006		DQ772843.1
<i>Vibrio cholerae</i> strain N16961 MATE-VCD43	India	2007	Phân bệnh nhân	EU263362.1
<i>Vibrio cholerae</i> strain N16961 MATE-AshVCD44	India	2007	Phân bệnh nhân	EU263363.1

2.3. Xử lý số liệu

Xử lý kết quả bằng phần mềm BioEdit (phân tích kết quả giải trình tự), phần mềm MEGA 5.05.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định tính miễn cảm kháng sinh của *V. cholerae*

Kết quả khảo sát sự nhạy cảm và kháng kháng sinh của 6 chủng thuộc *V. cholerae* được thể hiện qua bảng sau:

Bảng 3. Kết quả xác định tính miễn cảm kháng sinh của *V. cholerae*

Kháng sinh	Ký hiệu	Số mẫu kiểm tra	Nhạy cảm		Trung gian		Kháng	
			Số mẫu	%	Số mẫu	%	Số mẫu	%
Streptomycin	STH	6	3	50	0	0	3	50
Norfloxacin	NOR	6	6	100	0	0	0	0
Ampicillin	AMP	6	5	83	0	0	1	17
Tetracyclin	TCY	6	4	67	0	0	2	33
Azithromycin	AZM	6	4	67	0	0	2	33
Amoxicillin-clavulanic acid	AMC	6	5	83	0	0	1	17
Sulfamethoxazole Trimethoprim	STX	6	4	67	0	0	2	33
Vancomycin	VAM	6	2	33	0	0	4	67

Các kết quả trên cho thấy, các chủng *V. cholerae* nhạy cảm với nhiều loại kháng sinh

được sử dụng trên lâm sàng như norfloxacin 100%, ampicillin 83% và amoxicillin-

clavulanic acid 83%. Ngoài ra, *V. cholerae* đề kháng với vancomycin 67%, streptomycin 50%, tetracycline 33%, azithromycin 33%, trimethoprim-sulfamethoxazole 33% và vancomycin 67%. Các chủng *V. cholerae* phân lập ở miền Bắc Việt Nam từ năm 2007 đến 2010 luôn nhạy với các loại kháng sinh như ciprofloxacin 100% (nhóm Fluroquinolone bao gồm norfloxacin, ciprofloxacin), ampicillin 98%, azithromycin 95%. Đặc biệt đề kháng với trimethoprim-sulfamethoxazole 100%, tetracycline 29% (Huu Dat Tran *et al.*, 2012).

3.2. Kết quả phát hiện gen kháng thuốc của vi khuẩn *V. cholerae*

Trong các chủng *V. cholerae* đã phân lập, có nhiều chủng đa kháng kháng sinh, chủng O3.2 kháng với 3 loại kháng sinh tetracycline, vancomycin, azithromycin; chủng O1.2 kháng với 3 loại kháng sinh ampicillin, vancomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole; chủng N8 kháng với 2 loại kháng sinh tetracycline, vancomycin; chủng 81V1 kháng với 2 loại kháng sinh là azithromycin và amoxicillin-clavulanic acid; chủng Ng3 kháng với 2 loại kháng sinh streptomycin và vancomycin.

Bảng 4. Kết quả phát hiện gen kháng kháng sinh của *V. cholerae*

Mã code (n=6)	Kháng kháng sinh	Gen kháng kháng sinh	Các gen được phát hiện
O3.2 (T1)	TCY, VAM, AZM	<i>bla_{SHV}</i> <i>aac(3)-IV</i> , <i>tetA</i> và <i>dhfrI</i>	<i>tetA</i>
O1.2 (T2)	AMP, VAM, STX	<i>bla_{SHV}</i> <i>aac(3)-IV</i> , <i>tetA</i> và <i>dhfrI</i>	-
N8 (T3)	TCY, VAM	<i>bla_{SHV}</i> <i>aac(3)-IV</i> , <i>tetA</i> và <i>dhfrI</i>	<i>tetA</i>
85V1 (T4)	STX	<i>bla_{SHV}</i> <i>aac(3)-IV</i> , <i>tetA</i> và <i>dhfrI</i>	-
81V1 (T5)	AZM, AMC	<i>bla_{SHV}</i> <i>aac(3)-IV</i> , <i>tetA</i> và <i>dhfrI</i>	-
Ng3 (T6)	STH, VAM	<i>bla_{SHV}</i> <i>aac(3)-IV</i> , <i>tetA</i> và <i>dhfrI</i>	-

Ghi chú: STH (streptomycin), AMP (ampicillin), AMC (amoxicillin-clavulanic acid), AZM (azithromycin), STX (Sulfamethoxazole-Trimethoprim), TCY (tetracycline) và VAM (vancomycin).

Từ năm 2008 - 2010, tại Việt Nam đã phát hiện các chủng *V. cholerae* đa kháng với các loại kháng sinh: ampicillin, tetracycline và trimethoprim-sulfamethoxazole (Tran *et al.*, 2012). Điều đó cho thấy các chủng kháng thuốc sẽ tiềm ẩn nguy cơ lan truyền đến các nước lân cận. Hầu hết các *V. cholerae* O1 phân lập ở Thái Lan từ năm 2003 đến năm 2011 đều có khả năng kháng lại trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracycline - các loại thuốc được sử dụng thường xuyên để điều trị bệnh tiêu chảy cấp và bệnh tả (Supawat *et al.*, 2009).

Phần lớn các chủng *V. cholerae* phân lập ở Việt Nam vẫn còn nhạy cảm với kháng sinh azithromycin (95%), đây là loại kháng sinh được sử dụng để điều trị bệnh tiêu chảy ở nhiều nước

(de Saussure, 2009). Nhìn chung, những chủng *V. cholerae* phân lập ở Việt Nam có những đặc điểm kháng kháng sinh tương tự như những chủng phân lập ở Ấn Độ và Thái Lan (Jain *et al.*, 2011).

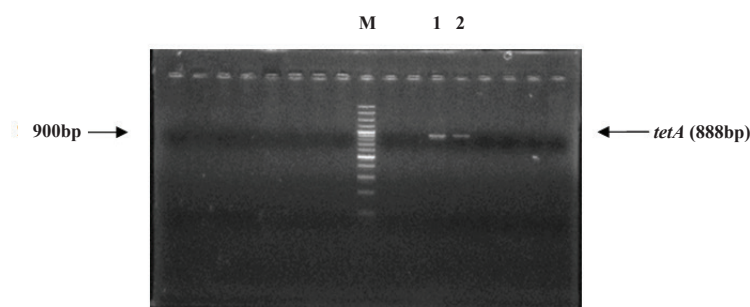
3.3. Xác định gen kháng kháng sinh của *V. cholerae* bằng kỹ thuật PCR

Kết quả cho thấy các sản phẩm PCR có kích thước khoảng 888bp, tương ứng với đoạn gen *tetA* được phát hiện ở 2 chủng *V. cholerae*. Gen *tetA* có trình tự bảo tồn đặc trưng cho *V. cholerae* nên các sản phẩm PCR quan sát được đều thuộc loài vi khuẩn này.

Qua nghiên cứu, chưa phát hiện chủng *V. cholerae* mang gen kháng kháng sinh *bla_{SHV}*

aac(3)-IV và *dhfrI*. Chúng *V. cholerae* (T1) phân lập từ môi trường nước biển và chủng *V. cholerae* (T3) phân lập từ ngẫu nhiên mang gen kháng kháng sinh tetracycline, thuộc nhóm kháng sinh Aminoglycosid. Như vậy, một số chủng trong nghiên cứu không chứa gen kháng kháng sinh tetracycline (*tetA*), nhưng chúng vẫn có khả năng kháng với tetracycline. Kết quả này cũng tương tự như kết quả của Dang và cs. (2006). Nghiên cứu của Thungapathra *et al.* (2002) đã cho thấy trong tổng số 94 chủng thuộc *Vibrios* phân lập được, có 43 chủng chứa R-plasmid đề kháng với ampicillin, neomycin, tetracycline, gentamycin,

streptomycin, sulfonamide, furazolidone và chloramphenicol. Những kết quả nghiên cứu khác cũng cho thấy vi khuẩn *Vibrio* spp. kháng với một số loại thuốc có trong thức ăn hải sản. Cơ chế kháng phổ biến là thông qua plasmid chứa gen kháng thuốc và gen kháng này được gắn vào vi khuẩn qua các yếu tố như integrons, transposons (gen nhảy). Đây là một yếu tố quyết định tính kháng kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio* spp. Hơn nữa, vi khuẩn *Vibrio* spp. có khả năng truyền các gen kháng kháng sinh mã hoá plasmid sang người một cách trực tiếp hoặc gián tiếp (Raissy *et al.*, 2012).



Hình 1. Sản phẩm khuếch đại đoạn gen *tetA*
M: thang chuẩn 100bp, 1: *V. cholerae* T1, 2: *V. cholerae* T3

Ở Việt Nam, sự bùng phát bệnh dịch tả vào những 1995, 2000 và 2002 bởi những gen khác nhau của *V. cholerae* O1 (Ehara *et al.*, 2004). Nhiều giả thiết cho rằng những nhóm vi khuẩn kháng thuốc luôn hiện diện trong hệ vi khuẩn ngoài môi trường, chúng sinh sản rất nhanh; hoặc chúng có thể lan truyền từ các nước khác và từng nhóm sẽ tạo ra sự bùng phát dịch bệnh. Mặt khác, trong một nhóm vi khuẩn sẽ trải qua quá trình trao đổi gen, chèn thêm hoặc xóa các gen kháng kháng sinh, từ đó xuất hiện một nhóm vi khuẩn kháng thuốc mới (Ehara *et al.*, 2004).

Hầu hết những chủng thuộc *Vibrio* phân lập từ Việt Nam đều đa kháng thuốc, phổ biến nhất là nalidixic acid, cotrimoxazole và tetracycline. Tetracycline là kháng sinh dùng

phổ biến trong điều trị bệnh tả, 29% số chủng *V. cholerae* phân lập ở miền Bắc Việt Nam từ năm 2007 đến 2010 kháng với tetracycline (Huu Dat Tran *et al.*, 2012). Cả hai kháng sinh tetracycline và doxycycline thuộc nhóm kháng sinh tetracycline và sẽ có hiện tượng kháng chéo giữa các nhóm vi khuẩn thuộc *Vibrio*. Nếu sử dụng doxycycline để điều trị bệnh do *V. cholerae* O1 thì tetracycline cần phải được theo dõi thường xuyên (Fluit *et al.*, 2005).

3.4. Kết quả giải trình tự, so sánh trình tự các đoạn gen kháng kháng sinh

Nghiên cứu đã giải mã được đoạn gen *DKKS-T1-TraVinhVN-2014*, *DKKS-T3-TraVinhVN-2014* thuộc vi khuẩn *V. cholerae*. Kết quả so sánh trình tự được trình bày tại bảng 5.

Bảng 5. Mức độ tương đồng đoạn gen kháng kháng sinh của *V. cholerae* (T1 và T3) với các trình tự trên Genbank bằng công cụ BLAST

Số hiệu gen	Chủng	Điểm	Che phủ	Ý nghĩa	Tương đồng
AB213657.1	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1 vcmD	909	95%	0.0	97%
CP001235.1	<i>Vibrio cholerae</i> O395 (I)	1534	84%	0.0	97%
AP014524.1	<i>Vibrio cholerae</i> MS6 DNA, (I)	1534	84%	0.0	97%
CP001233.1	<i>Vibrio cholerae</i> M66-2 (I)	1534	84%	0.0	97%
CP003330.1	<i>Vibrio cholerae</i> IEC224 (I)	1534	84%	0.0	97%
CP003069.1	<i>Vibrio cholerae</i> O1 str. 2010EL-1786	1534	84%	0.0	97%
CP001485.1	<i>Vibrio cholerae</i> MJ-1236 (I)	1534	84%	0.0	97%
DQ772843.1	<i>Vibrio cholerae</i> clone FLH214558-USA-2006	1134	83%	0.0	97%
CP002555.1	<i>Vibrio cholerae</i> LMA3894-4 chromosome I	1516	85%	0.0	96%
EU263362.1	<i>Vibrio cholerae</i> strain N16961 MATE-AshVCD43	832	95%	0.0	94%
EU263363.1	<i>Vibrio cholerae</i> strain N16961 MATE-AshVCD44	826	95%	0.0	94%
EU263361.1	<i>Vibrio fluvialis</i> MATE-AshVFD69	837	95%	0.0	94%
EU263360.1	<i>Vibrio fluvialis</i> MATE -AshVFD53	837	95%	0.0	94%

Dựa vào kết quả giải trình tự các đoạn gen, so sánh với các trình tự tương đồng trên Genbank (BLAST), trong nghiên cứu này đã chọn ra những trình tự tương đồng cao với trình tự đoạn gen gồm các mã số: AB213657.1, CP001235.1, AP014524.1, CP001233.1, CP003330.1, CP003069.1, CP001485.1, DQ772843.1, CP002555.1, EU263362.1, EU263363.1, EU263361.1, EU263360.1.

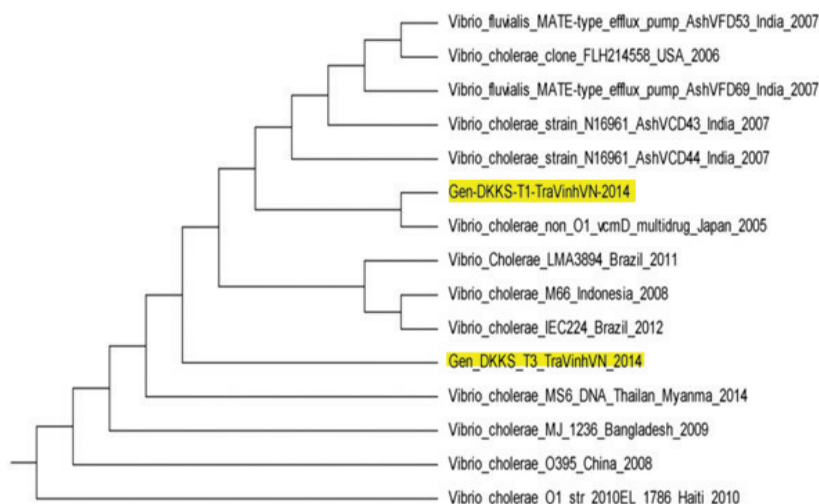
Từ giản đồ phả hệ thể hiện rõ về cơ chế tiến hóa liên quan đến các chủng kháng kháng sinh phân lập ngoài môi trường, từ thức ăn hải sản và từ bệnh nhân có triệu chứng lâm sàng. Trong nghiên cứu này, 2 chủng *V. cholerae* phân lập tại Trà Vinh có mang gen mã hoá kháng kháng sinh tetracycline phân lập trên mẫu nước và mẫu nghêu có tỷ lệ tương đồng về trình tự nucleotide với các chủng khác ở Thái Lan, Nhật Bản, Trung Quốc, Indonesia, Brazil và Ấn Độ, tương đồng 97% với 8 chủng; tương đồng 96% với 1 chủng và tương đồng 94% với 4 chủng (bảng 5).

Kết quả cây phát sinh chủng loài cũng chỉ ra rằng các chủng từ Việt Nam có mối liên hệ gần với nhiều chủng *V. cholerae* khác như *V. cholerae* non-O1 vcmD phân lập tại Nhật Bản

năm 2005, *V. cholerae* LMA3894 phân lập tại Brazil năm 2011, chủng *V. cholerae* M66 phân lập tại Indonesia năm 2008 và chủng *V. cholerae* IEC224 phân lập tại Brazil năm 2012.

Chủng *V. cholerae* non-O1 vcmD là chủng đa kháng kháng sinh mang gen *cmD* có cơ chế bơm kháng sinh ra khỏi màng tế bào giúp tế bào vi khuẩn có thể kháng với nhiều loại kháng sinh. Ngoài ra, chủng *V. cholerae* trong nghiên cứu của chúng tôi cũng có mối liên hệ tương đối gần với các chủng khác, bao gồm chủng *V. cholerae* 2010EL-1786, *V. cholerae* O395 phân lập tại Trung Quốc năm 2008, *V. cholerae* MJ-1236 phân lập tại Bangladesh năm 2009, *V. cholerae* MS6 phân lập tại Thái Lan năm 2014, *V. cholerae* non-O1 vcmD phân lập tại Nhật Bản năm 2005, 2 chủng *V. cholerae* N16961 phân lập tại Ấn Độ năm 2007, *V. cholerae* clone FLH214558 phân lập tại Mỹ năm 2006 và đặc biệt có mối liên hệ xa nhất với loài *V. fluvialis* phân lập tại Ấn Độ năm 2007, loài khác nhau thì có mối liên hệ di truyền về kháng kháng sinh khác nhau, mặc dù chúng đều có chung nguồn gốc là Vibrios.

Một nghiên cứu khác cho thấy nhiễm sắc thể 1 và 2 của chủng MS6 đã thường xuyên



Hình 2. Cây phát sinh chủng loài của *Vibrio cholerae* về kháng kháng sinh
(Tamura K., 2004; Tamura K., Peterson D, 2011)

được sửa đổi bởi sự truyền gen từ các loài thuộc *Vibrio* sau khi phân kỳ từ một tổ tiên chung, do đó những chủng có mối liên hệ gần sẽ có những đặc điểm tương tự về gen kháng kháng sinh (Kazuhisa *et al.*, 2014).

Trong khi đó chủng *V. cholerae* N16961 đã được chứng minh có sự di truyền gen đa kháng thuốc mã hóa cho gen *EmrD-3* (Smith, 2009, Floyd, 2013). Các chủng phân lập ở Thái Lan từ năm 2003 đến năm 2004 cũng cho thấy 100% acid amin tương đồng với các acid amin chủng N16961. Tuy nhiên, gen TCPA của *V. cholerae* O1 ET chủng trong năm 2007 và sau đó đã có một đột biến ở vị trí amino acid 64 và điều này cũng được tìm thấy ở chủng *V. cholerae* 2010EL1786 (GenBank: CP003069), chủng này đã từng gây ra dịch bệnh ở Haiti (Reimer *et al.*, 2011).

Ở Việt Nam năm 2000, những chủng *V. cholerae* O1 đề kháng tetracycline là do gen *tetA*, gen kháng trimethoprim cũng không được tìm thấy trong thời điểm này. Các chủng phân lập vào năm 2002 lại nhạy cảm với tất cả các loại thuốc kiểm tra. Từ năm 2010 - 2011, những chủng *V. cholerae* phân lập tại Việt Nam mang gen kháng kháng sinh tương tự như chủng phân lập tại Ấn Độ và Thái Lan, đã tạo ra một biến thể mới của *V. cholerae* O1 (Jain *et al.*, 2011).

Hai chủng trong nghiên cứu này có gen kháng kháng sinh tương tự với các chủng so sánh và nguy cơ về sự di truyền gen kháng kháng sinh là rất cao trong những chủng thuộc loài *V. cholerae*.

IV. KẾT LUẬN

Từ 6 chủng *V. cholerae* được thử nghiệm về tính kháng kháng sinh, tỷ lệ kháng với streptomycin là 50%, ampicillin là 17%, tetracycline là 33%, trimethoprim-sulfamethoxazole là 33% và vancomycin là 67%. Có 2 chủng *V. cholerae* trong tổng số 6 chủng được kiểm tra chứa gen *tetA* - gen mã hóa kháng tetracycline; các nhóm gen *bla_{SHV}*, *aac(3)-IV* và *dhfrI* mã hoá cho nhóm kháng sinh β -lactam, Aminoglycosid, Trimethoprim chưa được phát hiện trong nghiên cứu này.

Tỷ lệ tương đồng về trình tự nucleotide của 2 chủng *V. cholerae* mang gen kháng kháng sinh tetracycline so sánh với các chủng khác có tương đồng 97% với 8 chủng, tương đồng 96% với 1 chủng và tương đồng 94% với 4 chủng. Cây phát sinh chủng loài cũng chứng tỏ mối quan hệ gần của những chủng mang gen kháng kháng sinh luôn có nguy cơ tiềm ẩn trong những chủng *V. cholerae* ngoài môi trường và trong thức ăn có nguồn gốc hải sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bywater, R. J, 2004. *Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU*. J. Vet. Med. B. 51: 361-363.
2. Dang, H., Zhang, X., Song, L., Chang, Y. and Yang, G, 2006. *Molecular characterizations of oxytetracycline resistant bacteria and their resistance genes from mariculture waters of China*. Marine Pollution Bulletin, 52 (11), 1494-1503.
3. Ehara, E, B. M. Nguyen, D. T. Nguyen, C.Toma, N. Higa, and M. Iwanaga, 2004. *Drug susceptibility and its genetic basis in epidemic Vibrio cholerae O1 in Viet Nam*. Epidemiol. Infect. 132, 595–600.
4. Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ, 1998. *Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic Vibrio cholerae*. Microbiol Mol Biol Rev 62: 1301–1314.
5. Fluit, A. C., Florijn, A., Verhoef, J. & Milatovic, D, 2005. *Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tetracycline and amoxiciline*. Antimicrob Agents Chemother, 49: 1636–1638.
6. Floyd JT, Kumar S, Mukherjee MM, He G and Varela MF, 2013. *A review of the molecular mechanisms of drug efflux in pathogenic bacteria: A structure-function perspective*. Inc, Vol (3) 15-66.
7. Ghosh A, Ramamurthy T, 2011. *Antimicrobials & cholera: are we stranded?* J. Med Res 133: 225–231.
8. Huru Dat Tran, Munirul Alam, Nguyen Vu Trung, Hubert P. Endtz, and Heiman F. L. Wertheim, 2012. *Multi-drug resistant Vibrio cholerae O1 variant El Tor isolated in northern Viet Nam between 2007 and 2010*. Journal of Medical Microbiology, 61: 431–437.
9. Jain, M., Goel, A. K., Bhattacharya, P., Ghatole, M. & Kamboj, D. V, 2011. *Multidrug resistant Vibrio cholerae O1 El Tor carrying classical ctxB allele involved in a cholera outbreak in South Western India*. Acta Trop 117, 152–156.
10. Kaper JB, Morris JG, Jr., Levine MM, 1995. *Cholera*. Clin Microbiol Rev 8:48–86.
11. Kazuhisa Okada, Mathukorn Na-Ubol, Ichiro Nakagawa, Siriporn Chantaroj, et al, 2014. *Comparative Genomic Characterization of a Thailand–Myanmar Isolate, MS6, of Vibrio cholerae O1 El Tor, which Is Phylogenetically Related to a ‘US Gulf Coast’ Clone*. Volume 9 | Issue 6 | .
12. Raissy M; Moumeni M; Ansari M; Rahimi E, 2012. *Antibiotic resistance pattern of some Vibrio strains isolated from seafood*. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 11(3): 618-626
13. Reimer, A. R., Van Domselaar, G., Stroika, S., Walker, M., Kent, H., Tarr, C., Talkington, D., Rowe, L., Olsen-Rasmussen, M. & other authors, 2011. *Comparative genomics of Vibrio cholerae from Haiti, Asia, and Africa*. Emerg Infect Dis 17: 2113–2121.
14. Tamura K., Nei M., and Kumar S, 2004. *Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method*. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101:11030-11035.
15. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S, 2011. *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*. Molecular Biology and Evolution.
16. Teuber, M, 2001. *Veterinary use and antibiotic resistance*. Curr. Opin. Microbiol. 4: 493-499.
17. Thungapathra, M., Amita Sinha, K. K., Chaudhuri, S. R., Garg, P., Ramamurty, T., Nair, G. B. and Ghosh, A, 2002. *Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes aac(6')-Ib, dfrA5, dfrA12, and ereA2 in class 1 integrons in non-O1, non- O139 Vibrio cholerae strains in India*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(9): 2948-55.
18. Smith KP, Kumar S and Varela MF, 2009. *Identification, cloning, and functional characterization of EmrD-3, a putative multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from Vibrio cholerae O395*. Arch Microbiol. 191:903-11.
19. Smith, K. E., et al, 1999. *Quinolone-resistant Campylobacter jejuni infections in Minnesota*. N. Engl. J. Med. 340: 1525-153
20. Supawat, K., Huttayananont, S., Sawanpanyalert, P., Aswapokee, N. & Mootsikapun, P, 2009. *Antimicrobial resistance surveillance of Vibrio cholerae in Thailand from 2000 to 2004*. J Med Assoc, S82–S86.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*.
22. ISO/TS-1:2007. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic Vibrio spp.*

Ngày nhận 24-1-2019

Ngày phản biện 2-3-2019

Ngày đăng 1-5-2019

KHẢO SÁT CHẤT LƯỢNG SỮA BÒ TƯƠI TẠI XÃ PHÙ ĐỒNG, HUYỆN GIA LÂM, THÀNH PHỐ HÀ NỘI

**Cam Thị Thu Hà, Phạm Hồng Ngân,
Trương Lan Oanh, Nguyễn Thị Trang**
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

80 mẫu sữa thu thập tại các nông hộ và các trạm thu gom sữa trên địa bàn xã Phù Đồng, huyện Gia Lâm, Hà Nội đã được dùng để đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng và mức độ nhiễm tổng số vi khuẩn hiếu khí, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. và *Staphylococcus aureus*. Kết quả phân tích cho thấy, chất lượng các mẫu sữa đạt tiêu chuẩn về độ tươi, hàm lượng đạm, chất béo và chất khô ở mức trung bình (theo TCVN). Số mẫu sữa không đạt tiêu chuẩn vệ sinh về tổng số vi khuẩn hiếu khí là 26/80 (32,5%), vi khuẩn *E. coli* là 15/80 (18,75%), vi khuẩn *Salmonella* spp. là 3/80 (3,75%) và vi khuẩn *Staphylococcus aureus* là 11/80 (13,75%). Một số chủng vi khuẩn phân lập được gồm *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* có độc lực cao, 86,67% đến 100% gây chết chuột bạch thí nghiệm trong vòng 48 giờ sau gây nhiễm.

Từ khóa: Sữa tươi, chất lượng, vi khuẩn, Phù Đồng.

Evaluation on quality of raw fresh milk in Phu Dong commune, Gia Lam district, Ha Noi city

**Cam Thi Thu Ha, Pham Hong Ngan,
Truong Lan Oanh, Nguyen Thi Trang**

SUMMARY

A total of 80 raw milk samples collecting at the small scale farms and the milk collection stations in Phu Dong commune were used to evaluate some quality criterias and contamination of aerobic bacteria total, including *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* in milk. The studied result showed that the quality of milk collecting in Phu Dong commune reached the standards at average level on freshness, protein and fat contents, dry matter in milk in comparison with Viet Nameese standards (TCVN). However, the milk samples contaminating with aerobic bacteria total, *E.coli*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* were 26/80 (32.5%), 15/80 (18.75%), 3/80 (3.75%) and 11/80 (13.75%), respectively. The isolated pathogen bacteria strains presented high virulence (86.67 - 100% of tested strains) killed the experimental white mice within 48 hours.

Keywords: Raw fresh milk, quality, bacteria, Phu Dong.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sữa là nguồn thực phẩm rất bổ dưỡng, được mọi người sử dụng hàng ngày để bổ sung chất dinh dưỡng, giải khát và làm đẹp. Nhà nước ta đã có chủ trương, chính sách đẩy mạnh phát triển ngành chăn nuôi bò sữa, mục tiêu đến năm 2020 đàn bò sữa Việt Nam đạt 500 nghìn con, lượng sản xuất sữa trong nước khoảng 1.012,5 nghìn tấn (Hoàng Kim Giao, 2007).

Phù Đồng là xã thuộc ngoại thành Hà Nội có phong trào chăn nuôi bò sữa gần 30 năm nay. Những năm qua, phong trào chăn nuôi bò sữa ở Phù Đồng phát triển mạnh, đem lại thu nhập cao cho người chăn nuôi. Theo thống kê của thú y xã, năm 2018 tổng số hộ chăn nuôi bò sữa của xã là 520 hộ với tổng số bò là 1500 con. Tổng sản lượng sữa trung bình hàng năm là 7.100 tấn. Thị trường tiêu thụ sữa của xã hiện

nay chủ yếu là cung cấp cho nhà máy Vinamilk. Công ty có hỗ trợ giá cho người nông dân, ngoài ra còn có sự cạnh tranh giữa các công ty, giữa các trung tâm thu gom, vì vậy quyền lợi của người chăn nuôi đã được đảm bảo hơn. Tuy nhiên, việc kiểm soát chất lượng sữa ngay từ các nông hộ và từ các trạm thu gom chưa được tiến hành thường xuyên để đảm bảo chất lượng sản phẩm khi đến tay người tiêu dùng. Để kiểm soát chất lượng sữa, cần định kỳ giám sát tại tất cả các khâu, từ chăm sóc đàn bò sữa, quá trình vắt sữa, vận chuyển, bảo quản và chế biến thành sản phẩm đến tay người tiêu dùng. Sữa là thực phẩm chứa hàm lượng chất dinh dưỡng cao, môi trường thích hợp cho nhiều loài vi khuẩn phát triển, làm giảm chất lượng sữa và ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người. Theo FAO (1998), sữa nhiễm khuẩn có thể gây ra vấn đề lớn cho sức khỏe cộng đồng và là nguyên nhân gây ngộ độc thực phẩm. Vì vậy, để có được sản phẩm sữa an toàn trước khi đến với người tiêu dùng, các chỉ tiêu lý, hóa, vi sinh vật trong sữa cần phải được kiểm tra một cách nghiêm ngặt. Từ thực tiễn đó, chúng tôi đã tiến hành khảo sát chất lượng sữa bò tươi tại xã Phù Đồng - Gia Lâm - Hà Nội.

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

2.1. Nội dung

- Kiểm tra một số chỉ tiêu lý, hóa của sữa
- Kiểm tra một số chỉ tiêu vi sinh vật của sữa.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp thu thập mẫu: theo TCVN 6400:1998 (ISO 707:1997)
- Phương pháp xác định một số chỉ tiêu lý, hóa:
 - + Xác định độ acid chuẩn độ: theo TCVN 6843 - 2001 (ISO 6092:1980)
 - + Xác định hàm lượng chất khô: theo TCVN 5533 - 1991.

+ Xác định hàm lượng chất béo: theo TCVN 7083 - 2002 (ISO 11870 : 2000).

- Phương pháp xác định chỉ tiêu vi sinh vật:

+ Xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí: theo TCVN 4884 - 2005.

+ Xác định vi khuẩn *E. coli*: Theo TCVN 6505 - 1: 1999 (ISO 11866/1:1997): Phương pháp MPN (Most Probable number)

+ Phân lập vi khuẩn *Salmonella*: theo TCVN 6402 : 2007 (ISO 6785 : 2001)

+ Phân lập vi khuẩn *Staphylococcus aureus*: theo TCVN 4830 : 2005.

- Phương pháp xác định độc lực của các chủng vi khuẩn phân lập được: Kiểm tra độc lực của vi khuẩn theo phương pháp thường quy của Viện Thú y: Chọn chuột nhắt trắng có trọng lượng từ 18 - 20g, khỏe mạnh. Tiêm 0,2 ml canh trùng nguyên của chủng vi khuẩn cần kiểm tra đã nuôi cấy ở môi trường BHI ở nhiệt độ 37°C trong 24 h vào xoang phúc mạc. Theo dõi thời gian gây chết chuột và số chuột chết. Theo dõi triệu chứng, bệnh tích và phân lập vi khuẩn từ chuột chết.

- Phương pháp đánh giá chất lượng sữa tươi: Theo TCVN 7405:2004

- Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được thu thập, xử lý bằng Excel 2007 và Minitab16.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát một số chỉ tiêu lý, hóa của sữa bò tươi

3.1.1. Kết quả kiểm tra độ tươi của sữa bằng phương pháp cảm quan và thử cồn 75°

Sữa tốt ở dạng nhũ tương đồng đều, không vón cục, có màu vàng kem nhạt hay trắng ngà, có mùi đặc trưng của sữa tươi, có vị ngọt nhẹ. Sữa có vị đắng hoặc mùi khác thường, có thể do ảnh hưởng của thức ăn hay dụng cụ bảo quản sữa và cách bảo quản. Bình thường sữa

ở trạng thái đồng nhất, nhưng nếu để quá thời gian cho phép, sữa bị chua do vi khuẩn lactic trong sữa đã lên men đường lactose sinh ra acid lactic. Vì vậy, khi cho cón vào trong sữa, cón có tác dụng làm mất nước và làm biến

tính protein trong môi trường acid và gây ra hiện tượng đông vón sữa.

Để đánh giá độ tươi của sữa, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra 80 mẫu sữa tại xã Phù Đồng, kết quả được trình bày tại bảng 1.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra độ tươi của sữa

Phương thức	Số mẫu	Cảm quan		Thử cón 75°							
		Số mẫu đạt	Tỷ lệ (%)	Dương tính							
				+		++		+++		Tổng số	
				Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)
Nông hộ	40	40	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Trạm thu gom	40	35	87,5	1	2,5	1	2,5	0	0	2	5,0
Tổng	80	75	93,75	1	1,25	1	1,25	0	0	2	2,5

Ghi chú: + : Sữa có gợn nhỏ bám vào thành ống nghiệm.

++ : Sữa tua nặng hơn, các gợn bám nhiều vào thành ống nghiệm.

+++ : Sữa đông vón thành cục.

Trong tổng số 80 mẫu sữa kiểm tra, có 75 mẫu sữa đạt tiêu chuẩn về chỉ tiêu cảm quan, chiếm tỷ lệ 93,75% và có 78 mẫu sữa cho kết quả âm tính khi thử cón 75°, chiếm tỷ lệ 97,5%. Trong số 5 mẫu sữa không đạt tiêu chuẩn về chỉ tiêu cảm quan, khi tiến hành thử cón có 2 mẫu dương tính.

Sữa bò vắt tại các nông hộ ở xã Phù Đồng 100% đạt chỉ tiêu về cảm quan và âm tính với phản ứng thử cón. Điều này phản ánh được thực tế người dân đã có kỹ thuật và ý thức tốt trong công tác vệ sinh khi tiến hành vắt sữa. Chỉ có 5/80 mẫu (chiếm tỷ lệ 6,25%) lấy tại các trạm thu gom chưa đạt chỉ tiêu cảm quan và 2/80 mẫu (chiếm tỷ lệ 2,5%) dương tính với cón 75°, trong quá trình bảo quản theo thời gian từ các nông hộ đến nơi thu gom đã làm ảnh hưởng đến chất lượng sữa.

3.1.2. Kết quả đánh giá độ nhiễm khuẩn của sữa bằng phản ứng hoàn nguyên xanh methylen

Vi sinh vật khi xâm nhập vào sữa tiết ra một loại men là Reductaza có khả năng làm mất màu thuốc thử xanh methylen. Do vậy dựa vào thời gian mất màu của xanh methylen sẽ đánh giá được mức độ ô nhiễm vi sinh vật trong sữa tươi. Kết quả đánh giá độ nhiễm khuẩn của sữa bằng phản ứng hoàn nguyên xanh methylen trình bày ở bảng 2.

Số liệu tổng hợp ở bảng 2 cho thấy: trong số 80 mẫu sữa kiểm tra tại nông hộ và các trạm thu gom sữa trên địa bàn xã Phù Đồng, có 77/80 mẫu (chiếm 96,25%) có thời gian làm mất màu xanh methylen đạt tiêu chuẩn (trên 3 giờ), trong đó có 86,25% số mẫu sữa mất màu trong thời gian 3 giờ - 5 giờ 30 và 10% số mẫu kiểm tra trên 5 giờ 30 mới gây mất màu xanh methylen. Đây là những mẫu sữa lý tưởng được vắt trong điều kiện môi trường đảm bảo tiêu chuẩn, dụng cụ chứa đựng được vệ sinh cẩn thận.

Bảng 2. Kết quả kiểm tra độ nhiễm khuẩn của sữa bò tươi bằng phản ứng hoàn nguyên xanh methylen

Phương thức	Số mẫu	Thời gian mất màu xanh methylen							
		< 20 phút		20 phút - 3 giờ		3 giờ - 5 giờ 30		> 5 giờ 30	
		Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)
Nông hộ	40	0	0	0	0	34	85	6	15
Trạm thu gom	40	0	0	3	7,5	35	87,5	2	5
Tổng	80	0	0	3	3,75	69	86,25	8	10

Kết quả kiểm tra cho thấy, nhìn chung lượng sữa tươi của các nông hộ xã Phù Đồng sản xuất ra cung cấp cho thị trường đảm bảo về độ tươi. Chỉ có 3/40 mẫu lấy tại các trạm thu gom có thời gian làm mất màu dưới 3 giờ, không đảm bảo về độ tươi.

3.1.3. Kết quả xác định độ acid tổng số

Vì sinh vật ở trong sữa nếu để lâu sẽ phát triển, sản sinh acid lactic làm cho độ acid tổng số tăng lên. Do vậy dựa vào độ acid sẽ đánh giá được độ tươi của sữa tươi.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra độ acid tổng số

Địa điểm lấy mẫu	Số mẫu	Số mẫu đạt	Tỷ lệ (%)	Số mẫu không đạt	Tỷ lệ (%)	TCVS
Nông hộ	40	40	100	0	0	18 -22 độ Thomer
Trạm thu gom	40	37	92,5	3	7,5	
Tổng	80	77	96,25	3	3,75	

Kết quả kiểm tra cho thấy 96,25% số mẫu phân tích đạt chỉ tiêu về độ acid tổng số. Trong 40 mẫu thu thập từ các nông hộ, 100% số mẫu đạt tiêu chuẩn cho phép, đối với 40 mẫu tại các

trạm thu gom sữa, có 3 mẫu có độ acid tổng số vượt quá giới hạn vệ sinh.

3.1.4. Kết quả kiểm tra chỉ tiêu đậm, chất béo, vật chất khô và tỷ trọng của sữa bò tươi

Bảng 4. Kết quả kiểm tra chỉ tiêu đậm, chất béo, vật chất khô và tỷ trọng của sữa bò

Chỉ tiêu	Sữa tại nông hộ	Sữa tại trạm thu gom	Tiêu chuẩn
Đậm (%)	3,85 ± 0,027	3,72 ± 0,056	≥ 2,8
Chất béo (%)	3,71 ± 0,029	3,76 ± 0,037	≥ 3,2
Vật chất khô (%)	11,82 ± 0,039	11,78±0,062	≥ 11,5
Tỷ trọng (%)	1,031 ± 0,00019	1,029 ± 0,00031	1,026 – 1,033

Qua bảng kết quả nhận thấy: hàm lượng đậm trung bình của sữa tươi nguyên liệu tại các nông hộ và các trạm thu gom trên địa bàn xã Phù Đồng đều đạt tiêu chuẩn. Tỷ lệ đậm của sữa lấy trực tiếp tại các nông hộ là 3,85% và tại các trạm thu

gom là 3,72%. Sữa tươi nguyên liệu sau khi vắt, hàm lượng đậm cao hơn so với sữa tại các trạm thu gom do sữa tươi vừa vắt chưa có sự phân hủy các chất dinh dưỡng trong sữa. Tuy nhiên sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Tỷ lệ chất béo trung bình của sữa tươi lấy tại các nông hộ là 3,71% và tại các trạm thu gom sữa là 3,76%. Tỷ lệ này đạt tiêu chuẩn chất lượng, tuy nhiên vẫn ở mức trung bình và thấp hơn tỷ lệ mỡ sữa phân tích được trong nghiên cứu của tác giả Trần Quang Hạnh (2011), sữa bò tươi nguyên liệu nuôi tại Lâm Đồng có hàm lượng mỡ sữa trung bình là 3,87%. Theo nghiên cứu của Nguyễn Xuân Trạch, Mai Thị Thom (2004), sữa của giống bò lai Sind tại Phù Đồng có tỷ lệ chất béo 5,89% và tỷ lệ protein 3,47%. Sữa của con lai F1 (50%) có tỷ lệ mỡ 4,83%, tỷ lệ protein đạt 3,37%. So với nghiên cứu này, nghiên cứu của chúng tôi có kết quả tỷ lệ đậm cao hơn, nhưng tỷ lệ mỡ sữa thấp hơn.

Hàm lượng vật chất khô phân tích được trong sữa tươi lấy tại các nông hộ ngay sau khi

vắt cho giá trị trung bình là 11,82% và tại các trạm thu gom sữa là 11,78%. Kết quả nghiên cứu của Lê Thu Hà (2012) cho biết tỷ lệ vật chất khô của sữa bò tại xã Phù Đồng, huyện Gia Lâm trung bình là 8,76%. So với kết quả năm 2012, hàm lượng vật chất khô trong sữa bò tươi tại xã Phù Đồng đã tăng lên. Như vậy có thể thấy người chăn nuôi đã có sự thay đổi trong chế độ chăm sóc, chất lượng thức ăn cho bò đã được cải thiện.

3.2. Kết quả kiểm tra một số chỉ tiêu vi sinh vật trong sữa bò tươi tại xã Phù Đồng

3.2.1. Kết quả kiểm tra một số vi khuẩn trong mẫu sữa tươi tại xã Phù Đồng

Kết quả kiểm tra 80 mẫu sữa tươi nguyên liệu tại xã Phù Đồng được trình bày tại bảng 5.

Bảng 5. Kết quả kiểm tra một số vi khuẩn trong mẫu sữa tươi tại xã Phù Đồng

Nơi lấy mẫu	Số mẫu	TSVKHK		<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
		Số mẫu không đạt	Số lượng (CFU/ml)	Số mẫu không đạt	Số lượng (MPN/ml)	Số mẫu không đạt	Số mẫu không đạt	Số lượng (CFU/ml)	
Nông hộ	40	9 (22,5%)	$3,12 \times 10^4 - 3,56 \times 10^6$	5 (12,5%)	0 – 16	1 (2,5%)	3 (7,5%)	$1,22 \times 10^2 - 1,75 \times 10^3$	
Trạm thu gom	40	17 (42,5%)	$5,3 \times 10^4 - 2,18 \times 10^7$	10 (25%)	0 – 12	2 (5%)	8 (20%)	$7,82 \times 10^2 - 6,14 \times 10^3$	
Tổng hợp	80	26 (32,5%)		15 (18,75%)		3 (3,75%)	11 (13,75%)		

Ghi chú: TSVKHK: Tổng số vi khuẩn hiếu khí

Kết quả xét nghiệm mẫu cho thấy có 26/80 mẫu (chiếm 32,5%) có ô nhiễm vi khuẩn hiếu khí tổng số vượt quá tiêu chuẩn vệ sinh cho phép (3×10^5 CFU/ml). Trong đó có 9 mẫu thu thập tại nông hộ và 17 mẫu thu thập tại các trạm thu gom.

Theo tiêu chuẩn vệ sinh, mật độ vi khuẩn *E. coli* trong mẫu sữa tươi là ≤ 3 MPN. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ nhiễm *E. coli* vượt quá chỉ tiêu cho phép là 18,75%. Sữa tại các nông hộ có 5/40 mẫu không đạt tiêu chuẩn (chiếm

12,5%) và sữa tại các trạm thu gom có 10/40 mẫu không đạt tiêu chuẩn (chiếm 25%).

Đối với thực phẩm tươi sống, đặc biệt là sữa tươi, việc phát hiện ra vi khuẩn *Salmonella* đã phản ánh tình trạng vệ sinh cũng như bảo quản chưa đạt yêu cầu. Sự có mặt của *Salmonella* trong thực phẩm nói chung và trong sữa nói riêng cảnh báo rằng thực phẩm đó không an toàn với sức khỏe con người, chỉ với một lượng rất ít vi khuẩn *Salmonella* trong thực phẩm có thể gây

nên những vụ ngộ độc cấp tính. Vì mức độ nguy hiểm của *Salmonella* nên trong quy chuẩn kỹ thuật quốc gia Việt Nam (2016) quy định không được có *Salmonella* trong 25g thực phẩm. Trong nghiên cứu này, khi phân tích 80 mẫu sữa tươi đã phát hiện được 3 mẫu (chiếm tỷ lệ 3,75%) nhiễm vi khuẩn *Salmonella*, trong đó có 1 mẫu lấy tại nông hộ và 2 mẫu lấy tại các trạm thu gom.

Đồng thời tiến hành phân tích vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, kết quả cho thấy 11/80 mẫu có số lượng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* vượt quá tiêu chuẩn cho phép (5×10^2 CFU/ml) (chiếm tỷ lệ 13,75%), trong đó có 3 mẫu thu thập tại các nông hộ và 8 mẫu thu thập tại các trạm thu gom.

Kết quả trên cho thấy tỷ lệ mẫu sữa không đạt chỉ tiêu vi sinh vật lấy tại các nông hộ cao hơn so với mẫu sữa lấy tại các trạm thu gom. Sự sai khác này có ý nghĩa thống kê được kiểm định Chi-square, $p < 0,05$. Điều này cho thấy nguy cơ nhiễm khuẩn tại các trạm thu gom cao hơn ở các nông hộ.

Thực tế tại các trạm thu gom, sữa từ các nông hộ chăn nuôi được gom chung vào 1 thùng bảo quản lạnh. Vì vậy nguy cơ lây nhiễm vi khuẩn từ hộ cá thể vào toàn bộ lượng sữa được bảo quản tại trạm thu gom cũng như trong quá trình vận chuyển sữa là rất lớn. Bên cạnh đó, nếu dụng cụ chứa đựng, điều kiện vệ sinh tại các cơ sở thu gom không đảm bảo sẽ tạo điều kiện cho hệ vi sinh vật phát triển nhanh chóng, làm giảm chất lượng sữa tươi.

3.2.2. Kết quả kiểm tra độc lực của các chủng vi khuẩn phân lập được

Để khẳng định được khả năng gây bệnh của vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* phân lập được từ các mẫu sữa bò tươi không đạt tiêu chuẩn vệ sinh, chúng tôi tiến hành thử độc lực của các chủng vi khuẩn trên chuột bạch. Mỗi chủng tiêm cho 2 chuột thí nghiệm, mỗi chuột 0,2ml canh trùng. Đồng thời chúng tôi cũng tiến hành tiêm 0,2ml nước muối sinh lý cho chuột đối chứng và nuôi trong cùng điều kiện. Kết quả được trình bày tại bảng 6.

Bảng 6. Kết quả kiểm tra độc lực của các chủng vi khuẩn phân lập được

Nguồn mẫu	Số chủng thử	Số chuột tiêm	Kết quả kiểm tra độc lực						
			Giết chết 100% số chuột		Giết chết 50% số chuột		Thời gian chết sau tiêm (h)	Không giết chết chuột	
			Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)		Số chủng	Tỷ lệ (%)
<i>E. coli</i>	15	30	10	66,67	3	20	12 - 48	2	13,33
<i>Salmonella</i> spp.	3	6	3	100	0	0	12 - 36	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	22	7	63,63	3	27,27	12 - 48	1	9,1

Các chủng vi khuẩn đều có khả năng gây chết chuột thí nghiệm sau khoảng thời gian 12 - 48 giờ kể từ khi gây nhiễm. Vi khuẩn *E. coli* có 13/15 (chiếm tỷ lệ 86,67%) số chủng phân lập được gây chết chuột thí nghiệm, trong đó 66,67% số chủng gây chết 100% số chuột thí nghiệm và 20% số chủng gây chết 50% số chuột thí nghiệm. Với vi khuẩn

Salmonella spp., 3 chủng vi khuẩn phân lập được gây chết 100% số chuột thí nghiệm trong khoảng thời gian từ 12 - 36 giờ. Vi khuẩn *Staphylococcus aureus* có 10/11 (chiếm tỷ lệ 90,9%) chủng gây chết chuột thí nghiệm, trong đó 63,63% số chủng gây chết 100% số chuột thí nghiệm và 27,27% số chủng gây chết 50% số chuột thí nghiệm.

Kết quả phân lập lại vi khuẩn dương tính 100%. Cần thiết phải giám sát chặt chẽ chất lượng sữa tươi tại nông hộ và tại các trạm thu gom để loại bỏ ngay các mẫu sữa không đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm; giảm thiểu các vụ ngộ độc thực phẩm do tiêu thụ các sản phẩm sữa nhiễm vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella* spp. hoặc *Staphylococcus aureus*.

IV. KẾT LUẬN

Sữa tươi nguyên liệu tại xã Phù Đồng đảm bảo tiêu chuẩn chất lượng về các chỉ tiêu cảm quan, thử cồn, độ mất màu xanh methylen và độ acid tổng số. Hàm lượng đạm, chất béo và chất khô trong mẫu sữa phân tích đạt tiêu chuẩn chất lượng, tuy nhiên giá trị chưa cao.

Phân tích mức độ nhiễm khuẩn trong sữa vẫn phát hiện tỷ lệ nhất định số mẫu không đạt tiêu chuẩn, tổng số vi khuẩn hiếu khí vượt 32,5%, *E. coli* 18,75%, *Salmonella* spp. 3,75% và *Staphylococcus aureus* 13,75%. Các chủng vi khuẩn phân lập được phần lớn có khả năng gây chết chuột thí nghiệm trong thời gian từ 12 - 48 giờ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hoàng Kim Giao (2007). Chiến lược phát triển của ngành chăn nuôi Việt Nam giai đoạn 2008 – 2015 và tầm nhìn 2020. *Hội thảo ngành chăn nuôi Việt Nam sau khi gia nhập WTO*, Hội Chăn Nuôi Việt Nam, Hà Nội, ngày 6 tháng 12 năm 2007.
- Lê Thu Hà (2012). *Tìm hiểu quá trình thương mại hóa sản phẩm, đánh giá chất lượng sữa bò tươi của đàn bò sữa nuôi tại các nông hộ xã Phù Đồng, Gia Lâm, Hà Nội*. Luận văn Thạc sĩ Nông nghiệp, trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
- Trần Quang Hạnh (2011). *Nghiên cứu khả năng sinh trưởng, sinh sản, năng suất và chất lượng sữa của bò cái Holstein Friesian thuần HF, các thế hệ con lai F1, F2 và F3 giữa HF và lai Sind*. Luận án tiến sĩ Khoa học Nông nghiệp, Hà Nội.
- Nguyễn Xuân Trạch, Mai Thị Thơm (2004). Giáo trình chăn nuôi trâu bò. NXB Nông Nghiệp, Hà Nội.
- Tiêu chuẩn Việt Nam (1998). Sữa và các sản phẩm từ sữa - Hướng dẫn lấy mẫu. TCVN 6400:1988 (ISO 707: 1997).
- Tiêu chuẩn Việt Nam (2001). Xác định độ acid chuẩn độ. TCVN 6843 - 2001 (ISO 6092:1980).
- Tiêu chuẩn Việt Nam (1991). Xác định hàm lượng chất khô và hàm lượng nước. TCVN 5533 – 1991.
- Tiêu chuẩn Việt Nam (2002). Sữa và sản phẩm từ sữa. Xác định hàm lượng chất béo. TCVN 7083 - 2002 (ISO 11870 : 2000).
- Tiêu chuẩn Việt Nam (2005). Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng vi sinh vật trên đĩa thạch. TCVN 4884 - 2005.
- Tiêu chuẩn Việt Nam (1999). Sữa và sản phẩm sữa - Định lượng *E. coli* giả định. Phần 1: Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN). TCVN 6505 - 1: 1999 (ISO 11866/1:1997).
- Tiêu chuẩn Việt Nam (2007). Sữa và sản phẩm sữa - Phát hiện *Salmonella*. TCVN 6402 : 2007 (ISO 6785 : 2001).
- Tiêu chuẩn Việt Nam (2005). Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng *Staphylococci* có phản ứng dương tính với Coagulase (*Staphylococcus aureus* và các loại khác) trên đĩa thạch – Phần 1: Kỹ thuật sử dụng môi trường thạch Baird-Parker. TCVN 4830 : 2005.
- Tiêu chuẩn Việt Nam (2004). Sữa tươi nguyên liệu - Yêu cầu kỹ thuật. TCVN 7405:2004.

Ngày nhận 20-12-2018

Ngày phản biện 15-1-2019

Ngày đăng 1-5-2019

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ GEN GÂY BỆNH CỦA VI KHUẨN CHỊU NHIỆT *CAMPYLOBACTER* SPP. PHÂN LẬP TỪ THỊT LỢN VÀ THỊT GÀ TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Ngọc Minh Tuấn¹, Bùi Khánh Linh², Nguyễn Hoàng Thịnh²,
Nguyễn Thị Thu Hằng³, Trần Thị Hạnh⁴, Chu Đình Tới⁵, Mai Vũ Thanh¹

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, đã có 9 chủng vi khuẩn *Campylobacter* (8 chủng *C. jejuni* và 1 chủng *C. coli*) được sử dụng để xác định gen gây bệnh từ 20 chủng vi khuẩn *Campylobacter* được phân lập từ 150 mẫu thịt gà và thịt lợn tại Việt Nam. Kết quả nghiên cứu cho thấy 100% các chủng đều có các gen sau: gen điều khiển hoạt động của flagella (*flaA*, *flaB*, *flhA*, *flhM*), gen thực hiện chức năng xâm nhập (*cadF*, *docB*), gen sản sinh ra độc tố (*cdtA*, *cdtB*, *secD*, *secF*) và gen thực hiện chức năng sinh tổng hợp lipooligosaccharide (*pglB*). Trong khi đó, đã không phát hiện thấy được sự có mặt của 8 gen (*fliY*, *virB11*, *Cje1278*, *Cj1434c*, *Cj1138*, *Cj1438c*, *Cj1440c*, *Cj1136*). Tuy nhiên, đã phát hiện được một số gen ở vi khuẩn *C. jejuni* cho thấy có sự sai khác gen *ciaB* (22,2%), *Cje1280* (77,8%), *docC* (66,7%) và *cgtB* (55,6%), trong đó gen *iamA*, *cdtC* chỉ phát hiện thấy ở các chủng vi khuẩn *C. jejuni* mà không thấy ở chủng *C. coli*.

Từ khóa: Vi khuẩn *Campylobacter*, gen, thịt gà, thịt lợn.

Determining some pathogenic genes of heating resistant *Campylobacter* spp. isolated from chicken meat and pork in Viet Nam

Nguyen Ngoc Minh Tuan, Bui Khanh Linh, Nguyen Hoang Thinh,
Nguyen Thi Thu Hang, Tran Thi Hanh, Chu Dinh Toi, Mai Vu Thanh

SUMMARY

The result of this study showed that nine *Campylobacter* isolates (eight *C. jejuni* and one *C. coli*) from 20 strains were identified virulence gene by multiplex PCR, lipooligosaccharide (LOS) biosynthesis and further functions was tested. In all isolates carrying the motility flagella genes (*flaA*, *flaB*, *flhA*, *flhM*), colonization associated genes (*cadF*, *docB*), toxin production genes (*cdtA*, *cdtB*, *secD*, *secF*), and the LOS biosynthesis gene *pglB* were detected. Meanwhile, eight gene loci (*fliY*, *virB11*, *Cje1278*, *Cj1434c*, *Cj1138*, *Cj1438c*, *Cj1440c*, *Cj1136*) were not identified by PCR. However, there was the difference of the gene loci *ciaB* (22.2 %), *Cje1280* (77.8 %), *docC* (66.7 %), and *cgtB* (55.6 %) found. The gene *iamA*, *cdtC* were identified in all *C. jejuni* isolates but not in *C. coli*.

Keywords: Bacteria, *Campylobacter*, gene, pork, chicken meat.

¹. Trường Đại học Hùng Vương, Phú Thọ

². Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³. Viện Thú y

⁴. Viện nghiên cứu dịch bệnh nhiệt đới và bệnh lây truyền từ động vật sang người, Hà Nội

⁵. Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn chịu nhiệt *Campylobacter* là nguyên nhân gây tiêu chảy ở người trên toàn thế giới, đồng thời là tác nhân gây bệnh Campylobacteriosis - bệnh lây truyền giữa động vật và người (Alos và cs, 2001). Triệu chứng ở người mắc bệnh tiêu chảy do vi khuẩn *Campylobacter* gây ra diễn biến từ thể tiêu chảy nhẹ cho đến thể tiêu chảy nặng - viêm ruột-dạ dày chảy máu (Ketley và cs, 1997).

Gia cầm và các sản phẩm thịt gia cầm là nguồn dự trữ vi khuẩn *Campylobacter* spp. (Hafez, 2003; EFSA, 2015). Vi khuẩn *Campylobacter* cư trú trong đường ruột của gia súc, gia cầm và từ đó gây nhiễm thịt gia súc, gia cầm tươi sống (Weijtens MJ và cs, 1997). Quá trình giết mổ gia cầm không đảm bảo là nguy cơ lây nhiễm vi khuẩn sang người và các loại thịt gia súc khác (Pearce và cs, 2003). Sử dụng thịt gia súc và gia cầm tái sống, chưa nấu kỹ có nguy cơ bị nhiễm vi khuẩn *Campylobacter* spp. (Carrique Mas và cs, 2013). Các chủng vi khuẩn *Campylobacter* spp. gây bệnh ở người thường gặp là *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* (EFSA, 2015).

Tại Việt Nam, những nghiên cứu về vi khuẩn *Campylobacter* chưa nhiều. Một số công bố về tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Campylobacter* spp. ở người cho thấy: tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Campylobacter* spp. ở trẻ em bị tiêu chảy là 2-4%, ở người lớn dưới 1% (Bodhidatta và cs, 2007; My và cs, 2013; Trang và cs, 2007). Nghiên cứu phân lập các vi khuẩn gây tiêu chảy trẻ em ở các vùng nông thôn cho thấy 31% là vi khuẩn *Campylobacter* trên tổng số các vi khuẩn phân lập được (Isenbarger và cs, 2001). Công bố về tỷ lệ vi khuẩn *Campylobacter* ở các sản phẩm thịt cho thấy: tỷ lệ nhiễm *Campylobacter* ở thịt vịt và thịt gà là 23,9-53,7% (Carrique Mas và cs, 2006), tỷ lệ nhiễm *Campylobacter* ở thân thịt gà là 35,1% (Bao và cs, 2006).

Hiện tại những hiểu biết về cơ chế gây bệnh của vi khuẩn *Campylobacter*, đặc biệt là các nghiên cứu sinh học phân tử về *Campylobacter*, chưa được đầy đủ. Một lượng lớn các gen có vai trò quan trọng trong việc gây bệnh của vi khuẩn *Campylobacter* đã được xác định (Parkhill, 2000; Bang và cs, 2003; Hänel và cs, 2007; Müller và cs, 2006), gồm có các gen *flaA*, *flaB*, *flhA*, *fliM*

điều khiển hoạt động của flagella; gen *ciaB*, *iamA* thực hiện chức năng bám dính và xâm nhập vào tế bào biểu mô; gen *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* sản sinh ra các độc tố. Tuy nhiên, các nghiên cứu như vậy thường đơn lẻ và chưa có nghiên cứu nào giám định một cách hệ thống về những nhóm gen gây bệnh của vi khuẩn *Campylobacter*. Trên cơ sở nghiên cứu về các gen gây bệnh quan trọng, các gen gây bệnh được xếp thành 6 nhóm: gen điều khiển hoạt động flagella, gen thực hiện chức năng bám dính, gen thực hiện chức năng xâm nhập, gen sản sinh độc tố, gen bài tiết độc tố, gen thực hiện chức năng sinh tổng hợp lipooligosaccharide. Vì vậy, đề tài này đã được tiến hành nhằm xác định sự có mặt của các gen gây bệnh ở vi khuẩn chịu nhiệt *Campylobacter* phân lập từ thịt lợn và thịt gà tại Việt Nam.

II. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu

Xác định sự có mặt của các gen gây bệnh của các chủng vi khuẩn *Campylobacter* spp. phân lập được từ thịt lợn và thịt gà tại Việt Nam.

2.2. Nội dung nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và xác định chủng vi khuẩn *Campylobacter*

Các chủng vi khuẩn *Campylobacter* được phân lập từ 100 mẫu thịt gà và 50 mẫu thịt lợn. Các mẫu thịt gà và thịt lợn trên được lấy từ 2 lò mổ tại Hà Nội, sau đó bảo quản và chuyển đến phòng thí nghiệm bộ môn Vệ sinh thú y (Viện Thú y) để tiến hành phân lập theo tiêu chuẩn ISO 10272-1.

2.2.2. Xác định các gen gây bệnh của vi khuẩn *Campylobacter*

- Gen điều khiển hoạt động flagella (flagella gens): *flaA*, *flaB*, *flhA*, *fliM*, *fliY*.

- Gen thực hiện chức năng bám dính (invasion gens): *ciaB*, *iamA*, *virB11*.

- Gen thực hiện chức năng xâm nhập (colonization gens): *cadF*, *docA*, *docB*, *docC*.

- Gen sinh ra độc tố (toxin gens production): *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*.

- Gen bài tiết độc tố (secretory gens): *secD*, *secF*.

- Gen thực hiện chức năng sinh tổng hợp lipooligosaccharide (LOS gens): *pglB*, *Cje1278*, *Cje1280*, *Cj1434c*, *Cj1138*, *Cj1438c*, *Cj1440c*, *CgtB*, *Cj1136*.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp tách chiết DNA

DNA của các chủng vi khuẩn được tách chiết theo hướng dẫn của bộ KIT cung cấp bởi hãng Roche GmbH, Mannheim, Đức. DNA sau tách

chiết được kiểm tra số lượng theo hướng dẫn của hãng Fisher GmbH, Schwerte, Đức và được bảo quản ở -20°C.

2.3.2. Phương pháp xác định chủng *Campylobacter jejuni* và *Campylobacter coli*

Xác định chủng *C. jejuni* và *C. coli* được thực hiện theo phương pháp multiplex-PCR (m-PCR). Cặp mồi (primers) được sử dụng trong multiplex-PCR là *mapA* để khuếch đại đoạn gen có độ dài 589bp (*C. jejuni*) và *ceuE* để khuếch đại đoạn gen có độ dài 462bp (*C. coli*).

Gen đích	Trình tự	Kích thước sản phẩm	Loài
16S rRNA	ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAAAC GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT	857 bp	<i>Campylobacter</i>
<i>mapA</i>	CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A	589 bp	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>ceuE</i>	TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG AAT TGAAA TTT CTC CAA CTA TG	462 bp	<i>Campylobacter coli</i>
16S rRNA	ATT TAG AGT GCT CAC CCG AAG GGG AAA CTG GTAATC TAG AGT GG	522 bp	<i>Campylobacter lari</i>

Phản ứng PCR được thực hiện trong ống eppendorff 50µl bao gồm: 5µl buffer 10x Tag (Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany), 2µl dNTP mix (2mM, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), 2µl mỗi xuôi, 2µl mỗi ngược, 0,2µl Taq DNA polymerase (Jena Bioscience GmbH). Quy trình của phản ứng PCR được thực hiện như sau: chu kỳ đầu tiên thực hiện ở 96°C trong 1 phút, 35 chu kỳ tiếp sau được thực hiện ở 95°C trong 1 phút (denaturation DNA), 59°C trong 90s (annealing), 72°C trong 60s (elongation). Phản ứng PCR được tiến hành trên máy TRO Thermoblock (Biometra, Göttingen, Đức).

2.3.3. Phương pháp giám định các gen gây bệnh

Các gen gây bệnh được xác định dựa trên độ dài tương ứng của đoạn gen. Sử dụng phương pháp PCR với các cặp mồi chuyên dụng để khuếch đại các gen gây bệnh. Trình tự thực hiện và chu trình nhiệt độ của PCR được thực hiện theo hướng dẫn (Tuan Nguyen và cs, 2016). Các đoạn gen gây bệnh sau khi được khuếch đại bằng PCR sẽ được đọc kết quả bằng cách chạy điện di trên thạch agarose

gel 1,5% được nhuộm với Ethidium Bromide. Kết quả thu được là các file ảnh được chụp với máy chụp ảnh nền tối Bio Imaging System (Syngen, Cambridge, UK).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập và xác định chủng vi khuẩn *Campylobacter*

3.1.1. Kết quả phân lập

Kết quả phân lập vi khuẩn *Campylobacter* được trình bày qua bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy: 20 chủng (13,33%) vi khuẩn *Campylobacter* spp. đã được phân lập từ 100 mẫu thịt gà và 50 mẫu thịt lợn, trong đó có 15 chủng vi khuẩn *Campylobacter* phân lập được từ các mẫu thịt gà (15,00%) và 5 chủng phân lập được từ các mẫu thịt lợn (10,00%). Thịt bày bán tại các chợ nhỏ lẻ được xem là nguồn dự trữ mầm bệnh chủ yếu lây truyền vi khuẩn *Campylobacter*. Theo Lưu Quỳnh Hương và cs (2006), gần 30% thịt gà ở trường học, căng

tin bệnh viện và một số chợ nhỏ lẻ tại Hà Nội đã phát hiện thấy vi khuẩn *Campylobacter*. Tại Việt Nam, ở các chợ nhỏ lẻ, việc giết mổ gia súc, gia cầm chưa thực hiện theo quy trình giết

mổ và chưa có khu giết mổ chuyên biệt. Do vậy, thịt và các sản phẩm thịt có nguy cơ cao bị lây nhiễm chéo vi khuẩn *Campylobacter* giữa thịt lợn và thịt gà.

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Campylobacter* spp. từ các mẫu thịt lợn và thịt gà

Nguồn gốc mẫu	Số lượng mẫu (n)	Kết quả nuôi cấy phân lập (5% O ₂ , 10% CO ₂ , 85% N ₂ , 37°C 48 h)		Tỷ lệ (%)
		Muller Hinton	mCCDA	
Thịt gà	100	15	15	15,00
Thịt lợn	50	5	5	10,00
Tính chung	150	20	20	13,33

Từ kết quả phân lập trên đây, tiếp tục tiến hành xác định các chủng vi khuẩn *Campylobacter* gây bệnh dựa trên phản ứng multiplex PCR.

3.1.2. Kết quả xác định chủng bằng mPCR

Hai mươi chủng vi khuẩn *Campylobacter* đã được nuôi cấy phục hồi trên môi trường đặc hiệu Muller Hilton (agar) và mCCDA (agar) tại

Phòng thí nghiệm tham chiếu *Campylobacter*, Viện nghiên cứu bệnh lây truyền giữa động vật và người, Jena, CHLB Đức. Tại đây, chúng tôi tiến hành tách chiết DNA và phân lập định danh chủng bằng phương pháp multiplex PCR (mPCR).

Kết quả định danh các chủng vi khuẩn *Campylobacter* được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Định danh phân lập *C. jejuni* và *C. coli* bằng phương pháp mPCR

(1-11: DNA của các chủng vi khuẩn; 12: ĐC âm, 13: DNA ladder 100bp, 14: ĐC dương - *C. jejuni*, 15: ĐC dương - *C. coli*)

Kết quả cho thấy: Trong tổng số các chủng vi khuẩn *Campylobacter* spp. phân lập được, có 8 chủng là *C. jejuni* vì có độ dài DNA ở mức 589bp (so với đối chứng) và 1 chủng là *C. coli* vì có độ dài DNA ở mức 462bp (so với đối chứng). Có 2 chủng không phải là *Campylobacter* vì cho kết quả âm tính.

Như vậy, việc xác định các chủng loài vi khuẩn *Campylobacter* và phân biệt *C. jejuni* và *C. coli* đã được thực hiện nhờ phản ứng multiplex PCR

(mPCR). Phản ứng mPCR này không chỉ cho kết quả nhanh mà còn có thể phân biệt và xác định được chính xác các chủng loài vi khuẩn đồng thời trong cùng một lần chạy PCR.

3.2. Kết quả giám định các gen gây bệnh của các chủng *Campylobacter* phân lập được

Cơ chế gây bệnh của vi khuẩn *Campylobacter jejuni* và *Campylobacter coli* được xác định bởi sự có mặt của các gen gây bệnh. Tuy nhiên, hiểu biết về cơ

chế gây bệnh ở vi khuẩn này vẫn còn nhiều hạn chế. Vì vậy, xác định sự có mặt của các gen gây bệnh của vi khuẩn *Campylobacter* rất cần thiết và có nhiều ý nghĩa.

Kết quả giám định sự có mặt của các gen gây bệnh của các chủng *Campylobacter* spp. được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả giám định các gen gây bệnh của các chủng vi khuẩn *Campylobacter* spp. phân lập được

Ký hiệu chủng vi khuẩn	09CS 0040 a)	09CS 0043 a)	09CS 0046 a)	09CS 0047 a)	09CS 0049 a)	09CS 0067 a)	09CS 0066 b)	09CS 0068 b)	09CS 0051 a)
Loài	Cj ^{c)}	Cj ^{c)}	Cj ^{c)}	Cj ^{c)}	Cj ^{c)}	Cj ^{c)}	Cj ^{c)}	Cj ^{c)}	Cc ^{d)}
Nhóm gen điều khiển hoạt động flagella (flagella genes)									
<i>flaA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>flaB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>flhA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>fliM</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>fliY</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nhóm gen thực hiện chức năng bám dính (invasion genes)									
<i>ciaB</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>iamA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>virB11</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Nhóm gen thực hiện chức năng xâm nhập (colonization genes)									
<i>cadF</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>docA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>docB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>docC</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Nhóm gen sinh ra độc tố (toxin genes production)									
<i>cdtA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cdtB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cdtC</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nhóm gen thực hiện chức năng sinh tổng hợp lipooligosaccharide (LOS genes):									
<i>pglB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cje1278	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cje1280	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Cj1434c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cj1138	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cj1438c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cj1440c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cgtB</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Cj1136	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nhóm gen bài tiết độc tố (secretory genes)									
<i>secD</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>secF</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^{a)}Chủng vi khuẩn phân lập từ thịt gà; ^{b)}Chủng vi khuẩn phân lập từ thịt lợn; ^{c)} Cj – *Campylobacter jejuni*; ^{d)} Cc – *Campylobacter coli*

Kết quả bảng 2 cho thấy: Các gen *flaA*, *flaB*, *flhA* và *fliM* được tìm thấy ở tất cả các chủng *C. jejuni* và *C. coli* phân lập được, còn gen *fliY* đã không được tìm thấy ở chủng vi khuẩn nào. Gen *iamA* - gen có vai trò trong hoạt động bám dính và xâm nhập vào tế bào biểu mô tìm thấy ở tất cả các chủng *C. jejuni*, trong khi gen *ciaB* lại không thấy xuất hiện ở *C. jejuni* (09CS0049) và *C. coli* (09CS0051). Gen *virB11* chỉ được tìm thấy ở 2 chủng *C. jejuni* (09CS0043 và 09CS0047). Tất cả các chủng *C. jejuni* đều mang các gen *cadF* (gen màng ngoài protein), *docA* (gen mã hóa enzyme peroxidase), *docB* (gen mã hóa methyl-accepting chemotaxis protein). Tuy nhiên, phát hiện thấy gen *docC* (một loại gen mã hóa methyl-accepting chemotaxis protein) có mặt ở 3 chủng *C. jejuni* trong tổng số 9 chủng. Gen sản sinh độc tố *cdtA*, *cdtB* và *cdtC* có mặt ở tất cả các chủng phân lập được. Đây cũng chính là các gen sản sinh ra độc tố sung phòng - một trong những độc tố nguy hiểm của vi khuẩn *Campylobacter*.

Gen tổng hợp lipooligosaccharid là các gen đặc trưng của các chủng vi khuẩn *Campylobacter* phân lập được ở Việt Nam. Gen *pglB*, gen mã hóa enzyme vận chuyển oligosaccharyl, được tìm thấy ở tất cả các chủng. Các gen *Cje1278*, *Cje1280*, *Cj1434c*, *Cj1138*, *Cj1438c*, *Cj1440c*, *Cj1136*, *cgtB* là gen mã hóa enzyme vận chuyển phân tử đường galactose và rất hiếm khi được tìm thấy ở các chủng *Campylobacter* spp.

Sự có mặt của những gen gây bệnh của vi khuẩn *Campylobacter* spp. phân lập được tại Việt Nam có thể là những đặc điểm sinh học phân tử đặc trưng về khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn *Campylobacter* spp. phân lập được ở Việt Nam.

IV. KẾT LUẬN

- Đã xác định được gen độc lực của 8 chủng vi khuẩn *C. jejuni* và 1 chủng *C. coli* từ 20 chủng vi khuẩn *Campylobacter* được phân lập từ 150 mẫu thịt gà và thịt lợn.

- Có 4 gen điều khiển hoạt động của flagella (*flaA*, *flaB*, *flhA*, *fliM*), 2 gen thực hiện chức năng xâm nhập (*cadF*, *docB*), 4 gen sản sinh ra độc tố (*cdtA*, *cdtB*, *secD*, *secF*) và 1 gen thực hiện chức năng sinh tổng

hợp lipooligosaccharide (*pglB*).

- Có sự sai khác gen *ciaB* (22.2 %), *Cje1280* (77.8 %), *docC* (66.7 %) và *cgtB* (55.6 %), trong đó gen *iamA*, *cdtC* chỉ phát hiện thấy ở các chủng vi khuẩn *C. jejuni* mà không thấy ở chủng *C. coli*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alos BM. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis*. 2001; 32: 1201-6.
2. Ketley JM. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*. 1997; 143:5-21.
3. Hafez HM. Bacterial contaminations and risks from poultry meat and eggs. *Arch Geflügelk*. 2003; 67:146-52.
4. ESFA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J*. 2015; 12:3547.
5. Weijtens MJ, van der Plas J, Bijker PG, Urlings HA, Koster D, van Logtestijn JG, et al. The transmission of *Campylobacter* in piggeries; an epidemiological study. *J Appl Microbiol*. 1997; 83:693-8.
6. Pearce RA, Wallace FM, Call JE, Dudley RL, Oser A, Yoder L, et al. Prevalence of *Campylobacter* within a swine slaughter and processing facility. *J Food Prot*. 2003; 66:1550-6.
7. Carrique-Mas JJ, Bryant JE. A review of foodborne bacterial and parasitic zoonoses in Viet Nam. *EcoHealth*. 2013; 10:465-89.
8. Bodhidatta L, Lan NT, Hien BT, Lai NV, Srijan A, Serichantalergs O, et al. Rotavirus disease in young children from Ha Noi, Viet Nam. *Pediatr Infect Dis J*. 2007; 26:325-8.
9. My PV, Thompson C, Phuc HL, Tuyet PT, Vinh H, Hoang NV, et al. Endemic norovirus infections in children, Ho Chi Minh City, Viet Nam, 2009-2010. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19:977-80.

10. Trang DT, Hien BTT, Molbak K, Cam PD, Dalsgaard A. Epidemiology and aetiology of diarrhoeal diseases in adults engaged in wastewater-fed agriculture and agriculture in Ha Noi, Viet Nam. *Trop Med Int Health*. 2007; 12 (Suppl.2): 23-33.
11. Isenbarger DW, Hien BTT, Ha TT, Bodhidatta L, Pang LW et al. Prospective study of the incidence of diarrhoea and prevalence of bacterial pathogens in a cohort of Viet Nameese children along the Red River. *Epidemiol Infect*. 2001; 127:229-36.
12. Carrique-Mas JJ, Bryant JE, Cuong NV, Hoang NV, Campell J, Hoang NV, et al. An epidemiological investigation of *Campylobacter* in pig and poultry farms in the Mekong Delta of Viet Nam. *Epidemiology and economics*. 2006. www. Sciquest.org.nz.
13. Bao VN, Fries R, Zessin KH, Kyule MN, Pinthong R Baumann MPO. *Salmonella* and *Campylobacter* in broiler carcasses in Viet Nam. In: Proceedings of the 11th international symposium veterinary epidemiology and economics. 2006. www. Sciquest.org.nz.
14. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*. 2000; 403:665-8.
15. Bang DD, Nielsen EM, Scheutz F, Pedersen K, Handberg K, Madsen M. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. *J Appl Microbiol*. 2003; 94:1003-14.
16. Hänel I, Borrmann E, Müller J, Alter T. Relationships between bacterial genotypes and in vitro virulence properties of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from turkeys. *J Appl Microbiol*. 2007; 102:433-41.
17. Müller J, Schulze F, Müller W, Hänel I. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. *Vet Microbiol*. 2006; 113:123-9.
18. International Standards Organization: [ISO] 10272-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: detection method. 2006.
19. El-Adawy H, Hotzel H, Tomaso H, Neubauer H, Hafez HM. Elucidation of colonization time and prevalence of thermophilic *Campylobacter* species during turkey rearing using multiplex polymerase chain reaction. *Poult Sci*. 2012; 91:454-9.
20. Müller J, Schulze F, Müller W, Hänel I. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. *Vet Microbiol*. 2006; 113:123-9.
21. Müller J, Meyer B, Hänel I, Hotzel H. Comparison of lipooligosaccharide biosynthesis genes of *Campylobacter jejuni* strains with varying abilities to colonize the chicken gut and to invade Caco-2 cells. *J Med Microbiol*. 2007; 56:1589-94.
22. Luu Quynh Huong, Tran Thi Hanh, Phung Dac Cam, Nguyen Thi Be. Study on the Prevalence of *Campylobacter* spp. from Chicken Meat in Ha Noi, Viet Nam. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1081:273-5.

Ngày nhận 5-12-2018

Ngày phản biện 13-3-2019

Ngày đăng 1-5-2019

ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ Ô NHIỄM VI KHUẨN CHỈ ĐIỂM VỆ SINH THỰC PHẨM, ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA VI KHUẨN *E. COLI* TRONG THỊT LỢN TẠI TỈNH ĐIỆN BIÊN

Nguyễn Văn Tuyền

Trường Cao đẳng Kinh tế - Kỹ thuật Điện Biên

TÓM TẮT

Chúng tôi đã phân tích 90 mẫu thịt lợn thu tại các chợ bán lẻ của tỉnh Điện Biên từ tháng 6/2016 - 4/2017 để khảo sát mức độ ô nhiễm về chỉ tiêu tổng số vi khuẩn hiếu khí (TSVKHK) và *E. coli* ở thịt lợn. Kết quả phân tích cho thấy có 98,89% mẫu thịt dương tính với TSVKHK, trong đó tỷ lệ mẫu không đạt tiêu chuẩn vệ sinh là 48,89%. Có 75,56% mẫu thịt nhiễm *E. coli* với tỷ lệ mẫu không đạt tiêu chuẩn an toàn thực phẩm về mức nhiễm *E. coli* dao động từ 30% - 53,33% và số lượng vi khuẩn *E. coli* nhiễm trong các mẫu thịt này dao động trong khoảng $1,03 \times 10^2$ CFU/g đến $5,23 \times 10^2$ CFU/g. Trong đó, thịt lợn bán ở chợ trung tâm có tỷ lệ và cường độ nhiễm khuẩn vượt quá giới hạn cho phép là cao nhất. Tỷ lệ nhiễm khuẩn *E. coli* tăng dần và tỷ lệ thuận với thời gian sau giết mổ và tăng trong mùa Hè - Thu so với mùa Đông - Xuân. Các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được mang đầy đủ các đặc tính sinh vật, hóa học đặc trưng của giống và được xác định là có khả năng gây độc cho con người. Kết quả kiểm tra mức độ mẫn cảm với kháng sinh của 68 chủng vi khuẩn phân lập cho thấy có 67,65% - 91,18% số lượng chủng mẫn cảm với enrofloxacin, norfloxacin và gentamycin, spectinomycin. Các chủng *E. coli* phân lập đã kháng lại tetramycine (80,88%), streptomycin (77,94%), oxacillin (66,18%) và erythromycin (42,65%). Các chủng vi khuẩn đều có độc lực rất cao, gây chết 100% động vật thí nghiệm trong vòng 8 - 48 giờ sau khi tiêm.

Từ khóa: *Escherichia coli*, ngộ độc thực phẩm, ô nhiễm vi sinh vật, thịt lợn, Điện Biên.

Survey on microbial contamination, characteristics of *E. coli* bacteria in pork samples collected in Dien Bien province

Nguyen Van Tuyen

SUMMARY

This study was carried out to determine the prevalence of aerobic bacteria total and *E. coli* in pork selling in some markets of Dien Bien province. A total of 90 pork samples collected randomly at 3 local markets in Dien Bien province from June, 2016 to April, 2017 were analysed to determine the bacterial contamination in pork. The studied result showed that 98.89% of samples were positive with aerobic bacteria total. Of which, 48.89% of samples were contaminated with aerobic bacteria total over the limited level; 75.56% of samples were contaminated with *E. coli*. Of which, 30 - 53.33% of samples were contaminated with *E. coli* over the permitted level of food safety, with the bacterial numbers ranging from 1.03×10^2 CFU/g to 5.23×10^2 CFU/g. The highest infection rate and intensity of *E. coli* in pork were in the central market. The prevalence of *E. coli* in pork was gradually increased and proportional to the time after slaughter and also increased in summer - autumn rather than in winter - spring. The isolated *E. coli* strains carried all the bio-chemistry characteristics of the *E. coli* bacteria and caused poison for human. The antibiotic susceptibility test of 68 *E. coli* strains showed that 67.65% - 91.18% of the isolated strains were susceptible to enrofloxacin, norfloxacin, gentamycin and spectinomycin. The isolated *E. coli* strains were strongly resistant to tetramycine (80.88%), streptomycin (77.94%),

oxacillin (66.18%) and erythromycin (42.65%). All (100%) of the isolated *E. coli* strains were virulent, killing the experimental guinea pigs within 8 to 48 hours.

Keywords: *Escherichia coli*, food poisoning, microbial contamination, pork, Dien Bien province.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, ngộ độc thực phẩm xảy ra thường xuyên và với số lượng vụ ngộ độc thực phẩm rất lớn làm ảnh hưởng không nhỏ đến sức khỏe con người và kinh tế của người dân. Nguyên nhân là do thức ăn không đảm bảo vệ sinh, nhiều tạp chất, chất hoá học... đặc biệt do thức ăn nhiễm một số loại vi khuẩn như: *E. coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* và *Listeria monocytogenes*...

Những năm gần đây, tình trạng ngộ độc thực phẩm ở nước ta đang có xu hướng tăng và ảnh hưởng không nhỏ tới sức khỏe con người. Việt Nam là nước đang phát triển thuộc vùng nhiệt đới, trình độ sản xuất còn thấp cộng với khí hậu nóng ẩm đã tạo điều kiện cho nhiều loài vi sinh vật gây hại thực phẩm phát triển. Theo Tổng cục thống kê (2018), trong 6 tháng đầu năm 2018, cả nước xảy ra 44 vụ ngộ độc thực phẩm làm 1.207 người bị ngộ độc, trong đó có 7 trường hợp tử vong. Riêng tại tỉnh Điện Biên, chưa có kết quả nghiên cứu chính thức nào được báo cáo về tình hình ngộ độc thực phẩm có liên quan đến vi sinh vật.

Thực tế hiện nay, thực phẩm có nguồn gốc từ động vật, đặc biệt là thịt lợn bán ở một số chợ, cửa hàng lại không đảm bảo chất lượng. Điều đó cũng lý giải tại sao hàng năm có rất nhiều vụ ngộ độc thực phẩm xảy ra. Nguyên nhân gây ngộ độc thực phẩm là do ăn, uống một lượng lớn các vi sinh vật và các độc tố của chúng. Điều đáng chú ý ở đây là một số độc tố của chúng bền với nhiệt và khó bị phân hủy ở nhiệt độ cao như độc tố ruột enterotoxin của nhóm vi khuẩn enterotoxigenic *E. coli*. Hơn nữa vi khuẩn này còn có khả năng kháng kháng sinh streptomycin, spectinomycin..., khi gặp điều kiện thuận lợi có thể gây những bệnh nguy hiểm.

Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi đã tiến hành xác định mức độ ô nhiễm vi khuẩn chỉ điểm vệ sinh thực phẩm và đặc điểm sinh học của vi khuẩn *E. coli* trong thịt lợn bán tại một số chợ của tỉnh Điện Biên.

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

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu thịt lợn thu thập ngẫu nhiên tại 3 chợ bán lẻ khác nhau tại tỉnh Điện Biên.

- Các loại môi trường dùng trong nghiên cứu là các loại môi trường tổng hợp sẵn như Nutrient broth, BHI broth, Plate Count Agar, MacConkey agar, blood agar dùng cho nuôi cấy, giám định một số đặc tính sinh học của các vi khuẩn phân lập được.

- Các khoanh giấy tẩm kháng sinh của hãng Oxoid (Anh)

- Chuột bạch khỏe khối lượng từ 18 - 20 g/con.

- Hóa chất, dụng cụ, máy móc thuộc phòng thí nghiệm vi sinh vật.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập, xác định tỷ lệ và cường độ nhiễm TSVKHK, vi khuẩn *E. coli* từ các mẫu thịt lợn thu thập từ các chợ bán lẻ của thành phố Điện Biên Phủ vào các thời điểm khác nhau trong ngày và các mùa khác nhau trong năm.

- Xác định một số đặc tính sinh vật, hóa học của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được.

- Xác định khả năng gây độc trên động vật thí nghiệm của 1 số chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được.

- Xác định tính miễn cảm với một số kháng sinh của một số chủng *E. coli*.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp lấy mẫu

- Lấy mẫu thịt tươi theo TCVN 4833-1:2002, TCVN 4833-2:2002, ISO 3100-2:1988.

- Thu thập ngẫu nhiên 90 mẫu thịt lợn tại 3 chợ bán lẻ trên địa bàn thành phố Điện Biên Phủ. Mẫu được lấy vào 2 thời điểm là sau giết mổ 2 - 3 giờ và sau giết mổ 6 - 8 giờ. Thời gian từ tháng 6/2016 đến 4/2017. Mỗi mẫu được đựng riêng rẽ vào một túi nilong sạch, có ghi rõ ký hiệu. Các mẫu được bảo quản trong nhiệt độ lạnh (4 - 8°C) và chuyển ngay về phòng thí nghiệm Vi sinh, Viện Khoa học sự sống (Đại học Thái Nguyên) để xử lý mẫu trong ngày.

2.3.2. Phương pháp phân lập, giám định vi khuẩn

- Phương pháp phân lập vi khuẩn chỉ điểm an toàn thực phẩm trên thịt

Phân lập vi khuẩn theo TCVN 5667:1992 để xác định chỉ tiêu TSVKHK và TCVN 5155:1990 để xác định chỉ tiêu *E. coli* trên thịt lợn.

- Phương pháp phát hiện, giám định vi khuẩn *E. coli* trên mẫu thịt

Sau khi pha loãng mẫu và nuôi cấy mẫu theo quy trình trên môi trường MacConkey, bồi dưỡng ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ, chọn những khuẩn lạc điển hình để giám định các đặc tính

sinh hóa, làm cơ sở xác định chính xác loài *E. coli*.

- Kiểm tra độc lực của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được bằng phương pháp gây bệnh cho động vật thí nghiệm (Theo Carter và cộng sự, 1994). Canh trùng được tạo ra bằng cách lấy khuẩn lạc nuôi cấy vào môi trường BHI, bồi dưỡng tủ ấm 37°C trong 24 giờ, nồng độ vi khuẩn đạt 10^6 - 10^7 vi khuẩn/ml. Tiến hành tiêm canh trùng vào xoang phúc mạc của chuột bạch, liều tiêm 0,5ml canh trùng/con. Theo dõi trong vòng 7 ngày. Sau khi chuột chết, mổ khám kiểm tra bệnh tích rồi lấy máu tim cấy vào môi trường nước thịt, thạch máu và thạch MacConkey, bồi dưỡng tủ ấm 37°C trong 24 giờ, kiểm tra tính chất mọc, phết kính kiểm tra hình thái vi khuẩn và kết luận.

Phương pháp thử tính miễn cảm kháng sinh: Xác định tính miễn cảm của kháng sinh theo phương pháp của Kirby- Bauer.

2.3.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý bằng phương pháp thống kê sinh học của Nguyễn Văn Thiện (2000), Minitab 14, Excel.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xác định mức độ ô nhiễm vi khuẩn chỉ điểm vệ sinh thực phẩm trên thịt lợn

3.1.1. Kết quả kiểm tra TSVKHK trong thịt lợn

Bảng 1. Kết quả kiểm tra chỉ tiêu tổng số VKHK trong thịt lợn tươi

TT	Địa điểm	Chỉ tiêu khảo sát					Cường độ nhiễm ở các mẫu không đạt TCVN		
		Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)	Số mẫu không đạt TCVN *	Tỷ lệ (%)	Mức thấp nhất (CFU/g)	Mức cao nhất (CFU/g)	Mức trung bình (CFU/g)
1	Mường Thanh	30	29	96,67	15	50,00	1,01x10 ⁶	5,37x10 ⁶	3,49x10 ⁶
2	Him Lam	30	30	100	13	43,33	1,16x10 ⁶	4,25x10 ⁶	2,55x10 ⁶
3	Trung Tâm	30	30	100	16	53,33	1,02x10 ⁶	6,27x10 ⁶	3,68x10 ⁶
Tính chung		90	89	98,89	44	48,89	1,01x10 ⁶	6,27x10 ⁶	3,49x10 ⁶

* Quy định kỹ thuật theo TCVN 7046:2002, số khuẩn lạc (tổng số VK hiếu khí) $\leq 10^6$ CFU/g
CFU: Colony Forming Unit

Từ bảng 1, các kết quả thu được cho thấy: Tỷ lệ các mẫu dương tính với TSVKHK rất cao (98,89%), số mẫu không đạt tiêu chuẩn vệ sinh dao động từ 43,33% đến 53,33%. Mức nhiễm cao nhất từ $4,25 \times 10^6$ – $6,27 \times 10^6$ CFU/g; thấp nhất từ $1,01 \times 10^6$ – $1,16 \times 10^6$ CFU/g. Tại 3 địa điểm lấy mẫu, không có sự khác biệt rõ rệt ($P=0,128$). Kết quả nghiên cứu này thấp hơn kết quả của Khiếu Thị Kim Anh (2009), Nguyễn Thị Thu Trang (2008); các tác giả cho biết tỷ lệ mẫu thịt lợn nhiễm TSVKHK dao động từ 46,6% - 60,9%. Sở dĩ mức độ nhiễm khuẩn cao, vượt quá mức cho phép là do: địa điểm giết mổ mang tính chất tạm bợ, không đảm bảo vệ sinh, dụng cụ thủ công... Nguồn nước sử dụng cho các khâu giết mổ không đạt tiêu chuẩn vệ sinh. Sau khi giết mổ, thịt được vận chuyển thẳng tới các khu chợ bằng các phương tiện không đảm bảo tiêu chuẩn vệ sinh thú y, không được bao gói bảo quản. Việc bày bán thịt ở chợ tự do suốt cả ngày. Công tác kiểm tra vệ sinh thú y chỉ được diễn ra 1 lần, thường vào buổi sáng. Mức độ đánh giá sơ bộ chủ yếu ở

cảm quan. Do đó, không thể đảm bảo thịt luôn tươi ngon, không bị nhiễm khuẩn. Nhận xét này phù hợp với kết quả nghiên cứu của một số tác giả Lê Minh Sơn (2003) và Tô Liên Thu (2006) cho rằng thịt bị nhiễm khuẩn chủ yếu là do đất, nước, dụng cụ và quá trình vận chuyển từ điểm giết mổ đến nơi tiêu thụ.

3.1.2. Kết quả kiểm tra vi khuẩn *E. coli* trong thịt lợn

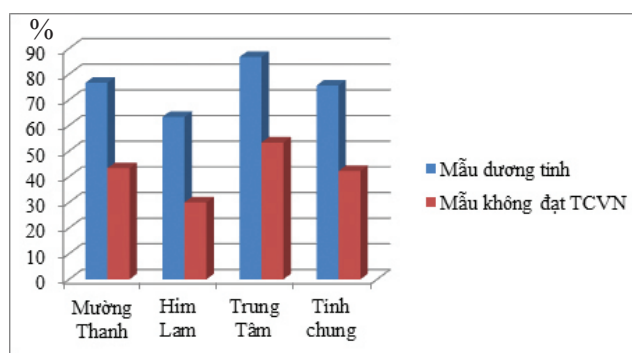
Đối với thực phẩm tươi sống, đặc biệt là thực phẩm có nguồn gốc động vật, việc kiểm tra chỉ tiêu *E. coli* là yêu cầu bắt buộc, nó là một trong những tiêu chuẩn cần thiết để đánh giá tình trạng vệ sinh thực phẩm.

Kết quả kiểm tra mức độ nhiễm khuẩn *E. coli* trên thịt lợn lấy từ 3 chợ bán lẻ đại diện cho phương thức buôn bán thịt lợn tại Điện Biên. Kết quả được tổng hợp trong bảng 2 và biểu đồ 1.

Bảng 2. Kết quả xác định tỷ lệ và cường độ nhiễm khuẩn *E. coli* trên thịt lợn

TT	Địa điểm (chợ)	Chỉ tiêu khảo sát				Cường độ nhiễm ở các mẫu không đạt TCVN			
		Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)	Số mẫu không đạt TCVN *	Tỷ lệ (%)	Mức thấp nhất (CFU/g)	Mức cao nhất (CFU/g)	Mức trung bình (CFU/g)
1	Mường Thanh	30	23	76,67	13	43,33	$1,05 \times 10^2$	$4,29 \times 10^2$	$2,01 \times 10^2$
2	Him Lam	30	19	63,33	9	30,00	$1,03 \times 10^2$	$3,68 \times 10^2$	$1,89 \times 10^2$
3	Trung Tâm	30	26	86,67	16	53,33	$1,19 \times 10^2$	$5,23 \times 10^2$	$2,28 \times 10^2$
Tính chung		90	68	75,56	38	42,22	$1,03 \times 10^2$	$5,23 \times 10^2$	$2,01 \times 10^2$

Quy định kỹ thuật theo TCVN 7046:2002, số vi khuẩn *E. coli* $\leq 10^2$ CFU/g; CFU: Colony Forming Unit



Biểu đồ 1. Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *E. coli* trên thịt lợn

Kết quả thu được ở bảng 2 và biểu đồ 1 cho thấy: trong 90 mẫu thịt lợn được kiểm tra, có 75,56% mẫu dương tính với *E. coli*, với 38 mẫu không đạt tiêu chuẩn vệ sinh thực phẩm, chiếm 42,22%. Mức nhiễm khuẩn tại các điểm lấy mẫu cao nhất từ $3,68 \times 10^2$ CFU/g – $5,23 \times 10^2$ CFU/g; mức nhiễm thấp nhất từ $1,03 \times 10^2$ CFU/g – $1,19 \times 10^2$ CFU/g; trung bình từ $1,89 \times 10^2$ CFU/g – $2,28 \times 10^2$ CFU/g. Tuy nhiên tỷ lệ này không có sự sai khác rõ rệt về địa điểm lấy mẫu ($P = 0,299$). Điều này phản ánh thực tế về tình trạng vệ sinh tại các chợ cũng như tại các địa điểm giết mổ.

Kết quả này phù hợp với công bố của Đỗ Bích Duệ và cs (2012), Trần Thị Ngọc Ánh (2015) cho biết tỷ lệ nhiễm *E. coli* không đạt TCVN là dao động từ 38,40% - 48,33%.

Trên thực tế, thịt lưu hành tại các chợ bị ô nhiễm là do: Việc giết mổ trên địa bàn phần lớn do tư nhân đảm nhiệm, địa điểm tạm bợ, dụng cụ giết mổ thô sơ, nguồn nước sử dụng bị ô nhiễm. Thịt lợn được bày bán xen kẽ với các mặt hàng khác (nội tạng), thực phẩm sống và chín bày trên cùng một bàn mà không có phân cách. Việc bày bán thịt tự do ở chợ diễn ra suốt cả ngày, thịt trên bàn không được che đậy, bảo quản. Nền chợ tuy đã được láng xi măng nhưng rãnh nước thải được thiết kế nổi, vệ sinh môi trường chợ kém, sau khi trời mưa rất bẩn. Đây là điều kiện thuận lợi để vi khuẩn có hại gây ô nhiễm vi khuẩn vào thịt.

E. coli là một chỉ tiêu quan trọng để xác định mức độ ô nhiễm vi khuẩn đối với thịt lợn, khi tiến hành xét nghiệm, nếu cường độ vượt quá 10^2 CFU/g chứng tỏ thịt đã bị ô nhiễm, vi phạm tiêu chuẩn an toàn vệ sinh thực phẩm. Mặt khác, tỷ lệ ô nhiễm của chỉ tiêu vi khuẩn nói lên tình trạng vệ sinh và quản lý thú y của các chợ, các địa điểm lấy mẫu. Địa điểm nào có tỷ lệ ô nhiễm cao chứng tỏ khu chợ đó chưa đạt tiêu chuẩn vệ sinh. Nhận xét này phù hợp với Lê Minh Sơn (2003) và Tô Liên Thu (2005).

a. Xác định chỉ tiêu vi khuẩn *E. coli* trên thịt lợn theo thời gian lấy mẫu

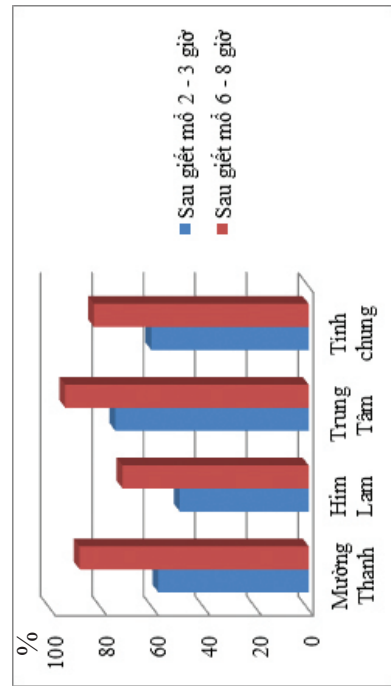
Để kiểm tra mức độ nhiễm vi khuẩn *E. coli* trên thịt lợn theo thời gian lấy mẫu trong ngày, chúng tôi đã tiến hành thu thập mẫu thịt lợn bán tại chợ ở các thời điểm sau giết mổ 2 - 3 giờ và sau 6 - 8 giờ để xác định tỷ lệ nhiễm *E. coli*. Kết quả trình bày ở bảng 3 và biểu đồ 2.

Tiến hành kiểm tra 36 mẫu thịt lợn sau thời gian giết mổ 2 - 3 giờ, có 22 mẫu dương tính với *E. coli*, 9 mẫu không đạt tiêu chuẩn vệ sinh, chiếm 25%. Số lượng vi khuẩn *E. coli* từ mẫu không đạt TCVS cao nhất là $3,76 \times 10^2$ CFU/g và thấp nhất là $1,03 \times 10^2$ CFU/g. Kiểm tra 54 mẫu thịt sau giết mổ 6 - 8 giờ, có 46 mẫu dương tính với *E. coli*, 53,7% mẫu không đạt TCVS, ở các mẫu không đạt TCVS cao nhất là $5,23 \times 10^2$ CFU/g và thấp nhất là $1,19 \times 10^2$ CFU/g. Mức độ nhiễm vi khuẩn *E. coli* theo thời gian thu thập mẫu có sự sai khác rõ rệt ($P=0,00$). Sở dĩ có sự chênh lệch về tỷ lệ nhiễm này là do: tại các chợ chúng tôi tiến hành điều tra thường giết mổ lợn vào thời điểm 4 - 5h sáng nên tại thời điểm chúng tôi lấy mẫu đều cách lúc giết mổ khoảng 2 - 3 tiếng, thịt chưa bị ôi thiu, ruồi nhặng bám vào ít, do vậy mức độ nhiễm sẽ chênh lệch không đáng kể. Tuy nhiên, mức độ nhiễm khuẩn chênh lệch như trên chủ yếu là do số lượng thịt bán vào buổi sáng còn tồn dư lại được tiếp tục bán vào buổi chiều, thêm vào đó thịt để lâu mà không được che đậy, bảo quản, nhiều ruồi nhặng bám vào nên rất dễ ôi thiu, tạo điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn sinh trưởng và phát triển. Những thức ăn được chế biến nếu sử dụng các sản phẩm từ thịt ôi thiu thì bản thân nó đã mang một nguồn vi khuẩn rất lớn. Ngoài ra, mức độ nhiễm khuẩn còn tùy thuộc vào từng thời điểm trong ngày, từng khu vực, vào những ngày thời tiết, khí hậu thay đổi, sự hoạt động của vi khuẩn càng có điều kiện phát triển mạnh hơn.

Bảng 3. Kết quả xác định vi khuẩn *E. coli* nhiễm trên thịt lợn tươi theo thời gian

		Mẫu kiểm tra sau giết mổ 2 - 3 giờ					Mẫu kiểm tra sau giết mổ 6 - 8 giờ								
Địa điểm	Tổng số mẫu kiểm tra	Chỉ tiêu khảo sát			Cường độ nhiễm của mẫu không đạt TCVN		Chỉ tiêu khảo sát			Cường độ nhiễm của mẫu không đạt TCVN					
		Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)	Số mẫu không đạt TCVN	Tỷ lệ (%)	Mức thấp nhất (CFU/g)	Mức cao nhất (CFU/g)	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)	Số mẫu không đạt TCVN	Mức thấp nhất (CFU/g)	Mức cao nhất (CFU/g)			
Mường Thanh	30	12	7	58,33	3	25,00	1,05x10 ²	3,26x10 ²	18	16	88,89	10	55,56	1,19x10 ²	4,29x10 ²
Him Lam	30	12	6	50,00	2	16,67	1,03x10 ²	2,55x10 ²	18	13	72,22	7	38,89	1,28x10 ²	3,68x10 ²
Trung Tâm	30	12	9	75,00	4	33,33	1,19x10 ²	3,76x10 ²	18	17	94,44	12	66,67	1,86x10 ²	5,23x10 ²
Tổng	90	36	22	61,11	9	25,00	1,03x10 ²	3,76x10 ²	54	46	83,33	29	53,70	1,19x10 ²	5,23x10 ²

Quy định kỹ thuật theo TCVN 7046:2002, số vi khuẩn *E. coli* ≤ 10²CFU/g; CFU: Colony Forming Unit

**Biểu đồ 2. Mức độ nhiễm khuẩn *E. coli* trên thịt lợn tươi theo thời gian lấy mẫu**

b. Xác định chỉ tiêu vi khuẩn *E. coli* trên thịt lợn theo mùa**Bảng 4. Tỷ lệ nhiễm khuẩn *E. coli* trên thịt lợn theo mùa**

Địa điểm	Mùa	Chỉ tiêu khảo sát				
		Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)	Số mẫu không đạt TCVN	Tỷ lệ (%)
Mường Thanh	Hè - Thu	18	16	88,89	10	55,56
	Đông - Xuân	12	7	58,33	3	25,00
Him Lam	Hè - Thu	14	11	78,57	7	50,00
	Đông - Xuân	16	8	50,00	2	12,50
Trung Tâm	Hè - Thu	17	16	94,12	11	64,71
	Đông - Xuân	13	10	76,92	5	38,46
Tính chung	Hè - Thu	49	43	87,76	28	57,14
	Đông - Xuân	41	25	60,98	10	24,39

Qua kết quả ở bảng 4 cho thấy: Tỷ lệ thịt lợn nhiễm khuẩn *E. coli* ở mùa Hè - Thu (87,76%) cao hơn mùa Đông - Xuân (60,98%). Mức độ nhiễm khuẩn *E. coli* theo mùa có sự khác biệt khi $P = 0,001$ ($P < 0,05$). Sở dĩ có sự chênh lệch về tỷ lệ nhiễm khuẩn như trên là do: vào mùa Hè - Thu, thời tiết nóng ẩm, khí hậu thay đổi thất thường, thời gian nóng bức kéo dài kèm theo nhiều cơn mưa lớn, nhiệt độ môi trường cao, ẩm độ cao, tạo điều kiện cho vi khuẩn sinh trưởng phát triển. Trong khi mùa Đông nhiệt độ môi trường giảm mạnh, thời tiết khô hanh và lạnh nên số mẫu nhiễm khuẩn *E. coli* cũng giảm đi đáng kể. Nhận định này phù hợp với thông báo của các chuyên gia ATTP: nguy cơ bị bệnh tả, lỵ ngộ độc thực phẩm thường gặp trong mùa Hè và chiếm tỷ lệ cao hơn so với các mùa khác trong năm.

3.2. Giám định đặc tính sinh vật hóa học của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được

Đã tiến hành kiểm tra một số đặc tính sinh vật, hóa học của 68 chủng vi khuẩn *E. coli* phân

lập được. Kết quả thu được trình bày ở bảng 5.

Từ bảng 5, các kết quả thu được cho thấy: các chủng *E. coli* phân lập được đều bắt màu đỏ, thuộc nhóm vi khuẩn Gram (-), đều có khả năng sinh Indol, lên men các loại đường Lactose, Maltose, Glucose, Fructose (100%); 100% dương tính với phản ứng MR và Sorbitol nhưng âm tính với phản ứng Citrat và VP. Các chủng vi khuẩn này đều không sinh H_2S . Có 67/68 chủng có khả năng di động (98,53%), còn 1/68 chủng không có khả năng di động (1,47%); Đặc biệt, khi nuôi cấy trên môi trường thạch máu, có 1/68 chủng có khả năng dung huyết mạnh. Điều này chứng tỏ các chủng *E. coli* này có khả năng gây bệnh cho người.

Như vậy, các chủng *E. coli* chúng tôi phân lập được đều thể hiện các đặc tính sinh vật, hóa học đặc trưng của giống *E. coli* và phù hợp với những đặc điểm về hình thái, tính chất nuôi cấy vi khuẩn và đặc tính sinh hóa mà Nguyễn Như Thanh và cs (2001), Lê Minh Sơn (2003), Tô Liên Thu (2006) đã công bố khi nghiên cứu về *E. coli*.

Bảng 5. Kết quả giám định đặc tính sinh vật hóa học của các chủng vi khuẩn *E. coli*

TT	Các thử nghiệm xác định đặc tính sinh vật hóa học	Kết quả giám định				
		Số chủng kiểm tra	Số chủng dương tính	Tỷ lệ %	Số chủng âm tính	Tỷ lệ %
1	Tính chất bắt màu gram âm	68	68	100	0	0
2	Sản sinh Indol	68	68	100	0	0
3	VP	68	0	0	68	100
4	MR	68	68	100	0	0
5	Phản ứng Citrat	68	0	0	68	100
6	Lên men Lactose	68	68	100	0	0
7	Lên men Maltose	68	68	100	0	0
8	Lên men Glucose	68	68	100	0	0
9	Lên men Fructose	68	68	100	0	0
10	Sorbitol	68	68	100	0	0
11	Sản sinh H ₂ S	68	0	0	68	100
12	Khả năng di động	68	67	98,53	1	1,47
13	Khả năng dung huyết	68	1	1,47	67	98,53

3.3. Thử độc lực của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được trên chuột thí nghiệm

Sử dụng chuột bạch để tiêm truyền canh

khuẩn nuôi cấy sau 24 giờ nhằm xác định độc lực của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được. Kết quả được tổng hợp trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả xác định độc lực của các chủng *E. coli* phân lập được

Số chủng thử	Số chủng giết chết chuột				Số chủng không giết chuột		Thời gian chuột chết (giờ)	Phân lập lại vi khuẩn (-/+)
	Giết 2/2 chuột thí nghiệm		Giết 1/2 chuột thí nghiệm					
	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)		
5	1	20,00	1	20,00	0	0,00	8 - 24 giờ	+
	0	0,00	3	60,00			24 - 48 giờ	+

Kết quả thu được cho thấy: 100% số chủng đem thử đều gây chết chuột. Trong đó có 1 chủng gây chết 100% chuột và 1 chủng gây chết 50% số chuột thí nghiệm trong vòng 8 - 24 giờ, 3 chủng gây chết 50% chuột trong 24 - 48 giờ. Điều này chứng tỏ độc lực của các chủng *E. coli* phân lập được là rất mạnh.

Chuột chết mổ khám thấy bệnh tích đặc trưng: Chỗ tiêm thủy thũng; ruột, dạ dày đầy

hơi; gan sưng nhão có nhiều điểm xuất huyết; lách, thận sưng, tím bầm. Từ gan, máu tim, phân lập được *E. coli*. Phân lập vi khuẩn từ bệnh tích (máu tim, gan, lách, ruột non...) của chuột chết đều tìm thấy *E. coli*.

3.4. Kết quả thử tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được

Để cung cấp thêm cơ sở khoa học và thực tiễn trong việc hỗ trợ điều trị ngộ độc thực phẩm

ở người, 68 chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được đã được tiến hành thử tính mẫn cảm với

một số loại kháng sinh. Kết quả thu được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Kết quả xác định tính mẫn cảm với một số loại kháng sinh hóa được của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được

TT	Tên kháng sinh & hóa được	Số chủng thử	Đánh giá mức độ mẫn cảm <i>E. coli</i>			
			Mẫn cảm		Kháng thuốc	
			+	%	+	%
1	Cephalexin	68	29	42,65	39	57,35
2	Streptomycin	68	15	22,06	53	77,94
3	Gentamycin	68	59	86,76	9	13,24
4	Norfloxacin	68	62	91,18	6	8,82
5	Oxacillin	68	23	33,82	45	66,18
6	Erythromycin	68	39	57,35	29	42,65
7	Spectinomycin	68	46	67,65	22	32,35
8	Enrofloxacin	68	57	83,82	11	16,18
9	Tetracyclin	68	13	19,12	55	80,88

Các kết quả thu được từ bảng 7 cho thấy: Các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được có tỷ lệ mẫn cảm với một số kháng sinh với tỷ lệ cao. Trong đó, Norfloxacin có tỷ lệ mẫn cảm với *E. coli* cao nhất (91,18%), thấp hơn là Enrofloxacin và Gentamycin với tỷ lệ lần lượt là 83,82%, 86,76%. Các kháng sinh Norfloxacin, Enrofloxacin có tỷ lệ mẫn cảm cao do đây là kháng sinh thế hệ mới, có hoạt phổ rộng. Mặt khác, các loại thuốc kháng sinh thuộc nhóm Quinolon đang bị cấm hoặc hạn chế sử dụng nên tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* còn mẫn cảm với nhóm kháng sinh này còn cao. Điều này chứng tỏ, tuy là một vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm, song bệnh do vi khuẩn này gây ra có thể điều trị hiệu quả nếu sử dụng đúng thuốc, đúng liều và đủ liệu trình.

Một số loại kháng sinh đem kiểm tra đã bị vi khuẩn *E. coli* kháng lại với tỷ lệ cao. Tetracyclin có tỷ lệ kháng cao nhất (80,88%), thấp hơn có Streptomycin và Oxacillin với tỷ lệ kháng lần lượt là 77,94% và 66,18%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu của Trần Thị Thùy Giang và cs (2014) [5] cho biết tại TP Hồ

Chí Minh và các tỉnh lân cận, vi khuẩn *E. coli* có tỷ lệ kháng cao với các loại kháng sinh thông thường như Streptomycin, Tetracyclin... Theo chúng tôi, các chủng vi khuẩn *E. coli* có tỷ lệ kháng cao đối với các kháng sinh này do đây là kháng sinh cũ, thường được sử dụng phổ biến trong điều trị và được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi để phòng bệnh và kích thích sinh trưởng trong thời gian dài. Các loại kháng sinh khác có tỷ lệ bị kháng dao động từ 32,35% đến 57,35%.

IV. KẾT LUẬN

Tỷ lệ nhiễm TSVKHK và *E. coli* trong thịt lợn đang tiêu thụ tại 3 chợ Mường Thanh, Him Lam, Trung Tâm của tỉnh Điện Biên lần lượt là 98,89% và 75,56%, trong đó tỷ lệ mẫu không đạt tiêu chuẩn vệ sinh về TSVKHK là 48,89% và *E. coli* là 42,22%.

Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *E. coli* tăng dần và tỷ lệ thuận với thời gian sau giết mổ và tăng cao trong mùa Hè - Thu so với thời điểm mùa Đông - Xuân.

Các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được đều thể hiện các đặc tính sinh vật, hóa học đặc trưng của giống.

Cả 5 chủng đem thử đều có độc lực rất cao, gây chết 100% động vật thí nghiệm trong vòng 48 giờ sau khi tiêm.

Vi khuẩn *E. coli* mẫn cảm với Enrofloxacin, Norfloxacin Gentamycin và Spectinomycin với tỷ lệ 67,65 % - 91,18%. Một số chủng *E. coli* đã kháng với kháng sinh Streptomycin, Oxacillin, Cephalixin (57,35% - 77,94%) và kháng rất cao với Tetracyclin (80,88 %).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alton G.G, G.R. Carter, A.C. Kibor và L.Pesti (1994). Chẩn đoán vi khuẩn học thú y: Sổ tay chẩn đoán phòng thí nghiệm một số bệnh chọn lọc ở vật nuôi (Lê Đình Chi và Trần Minh Châu dịch). NXB. Nông nghiệp. Sách xuất bản với sự thỏa thuận của Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hợp Quốc (FAO), tr. 104 - 141.
2. Khiếu Thị Kim Anh (2009), Đánh giá tình trạng ô nhiễm vi khuẩn chỉ điểm vệ sinh thực phẩm trong thịt lợn tại một số cơ sở giết mổ và kinh doanh trên địa bàn Hà Nội, Luận văn Thạc sĩ Nông nghiệp, Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
3. Trần Thị Ngọc Ánh (2015), *Thực trạng vệ sinh giết mổ lợn và sự ô nhiễm một số vi khuẩn ở thịt lợn sau giết mổ tại 3 thành phố thuộc tỉnh Quảng Ninh, đề xuất giải pháp khắc phục*, Luận văn Thạc sĩ Thú y, Đại học Nông lâm Thái Nguyên.
4. Đỗ Bích Duệ (2012), “Nghiên cứu một số đặc điểm của vi khuẩn *E. coli* trên thịt lợn tại một số chợ khu vực thành phố Thái Nguyên”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, tập 97, số 09, tr. 93 – 97.
5. Trần Thị Thùy Giang, Nguyễn Thị Nguyệt, Nguyễn Văn Trí, Nguyễn Thị Lệ Hồ, Vương Xuân Vân, Uông Nguyễn Đức Ninh, Phạm Minh Thu, Cao Hữu Nghĩa (2014), “Khảo sát độ nhiễm khuẩn và khả năng kháng kháng sinh của *E. coli* phân lập từ thực phẩm tại Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh”, *Tạp chí Khoa học, trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh*. Số 61, tr. 164 - 172
6. Phương pháp lấy mẫu thịt lợn tươi theo TCVN 4833 - 1:2002 và TCVN 4833 -2:2002, Hà Nội.
7. Lê Minh Sơn (2003), *Nghiên cứu một số vi khuẩn gây ô nhiễm thịt lợn vùng hữu ngạn sông Hồng*, Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, trường Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.
8. Nguyễn Như Thanh, Nguyễn Bá Hiên, Trần Thị Lan Hương (2001), *Vi sinh vật thú y*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
9. Nguyễn Văn Thiện (2008), *Phương pháp nghiên cứu trong chăn nuôi*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
10. Tiêu chuẩn Việt Nam (1990), *Thịt và sản phẩm của thịt - Phương pháp xác định và đếm số Escherichia coli*, TCVN – 5155.
11. Tiêu chuẩn Việt Nam (1992), *Thịt và sản phẩm của thịt, Phương pháp xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí trên thịt*, TCVN- 5667.
12. Tô Liên Thu (2006), *Nghiên cứu hiện trạng ô nhiễm một số vi khuẩn ở thịt lợn, gà tại Hà Nội và áp dụng biện pháp hạn chế sự phát triển của chúng*, Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Viện Thú y Quốc gia.
13. Tổng cục thống kê (2018), Thông cáo báo chí tình hình kinh tế - xã hội 6 tháng đầu năm 2018, <https://gso.gov.vn>, ngày 25/7/2018.
14. Nguyễn Thị Thu Trang (2008), *Khảo sát thực trạng hoạt động giết mổ, đánh giá tình trạng ô nhiễm vi khuẩn trong thịt lợn nơi giết mổ và bán tại chợ thuộc quận Kiến An, thành phố Hải Phòng, giải pháp khắc phục*, Luận văn Thạc sĩ Nông nghiệp, Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

Ngày nhận 27-7-2018

Ngày phản biện 27-9-2018

Ngày đăng 1-5-2019

Nâng cao - tham khảo

CÁC PHƯƠNG PHÁP CHẨN ĐOÁN DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI, CHẨN ĐOÁN PHÂN BIỆT VỚI DỊCH TẢ LỢN CỔ ĐIỂN VÀ MỘT SỐ BỆNH ĐỎ KHÁC

Nguyễn Đăng Thọ

Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương – Cục Thú y

I. Khái niệm bệnh dịch tả lợn châu Phi

Bệnh dịch tả lợn châu Phi (DTLCP) là bệnh truyền nhiễm ở lợn nuôi và lợn rừng thuộc mọi lứa tuổi. Bệnh cấp tính có đặc điểm sốt cao, xuất huyết ở hệ lưới nội mô và tỷ lệ chết cao. Lợn là loài động vật nuôi duy nhất cảm nhiễm với virus DTLCP. Lợn hoang dã ở châu Âu cũng cảm nhiễm với virus DTLCP, có biểu hiện lâm sàng và tỷ lệ chết tương tự như lợn nhà. Ngược lại, lợn hoang dã ở châu Phi như lợn nòi (*Phacochoerus aethiopicus*), lợn rừng (*Potamochoerus porcus*) và lợn rừng khổng lồ (*Hylochoerus meinertzhageni*) đề kháng với virus DTLCP, chúng thường ít hoặc không có biểu hiện bệnh. Những loài lợn hoang dã này đóng vai trò là vật chủ mang trùng virus DTLCP ở châu Phi. Các loại ve thân mềm thuộc giống *Ornithodoros*, đặc biệt là *O. moubata* và

O. erracticus là vector chứa bệnh và truyền bệnh DTLCP. Bệnh DTLCP không lây sang người nhưng gây chết nhiều lợn mà không có vaccin.

II. Tác nhân gây bệnh

- Virus DTLCP là tác nhân gây bệnh DTLCP, thuộc họ Asfarviridae, giống Asfivirus. Hiện nay, virus DTLCP là thành viên duy nhất của họ Asfarviridae. Virus DTLCP này là virus ADN, vỏ bọc hình khối đa giác phức tạp, có nhiều điểm tương đồng với các virus iridovirus và virus đậu. Virus này có ít nhất 28 protein cấu trúc và hơn 100 protein lây nhiễm, 50 trong số đó có phản ứng với huyết thanh của lợn nhiễm bệnh hoặc đã khỏi bệnh.

- Virus DTLCP được tìm thấy trong máu, cơ quan, dịch bài tiết từ lợn nhiễm bệnh và chết bởi bệnh này. Lợn sau khi khỏi bệnh sẽ ở thể mạn tính, có thể mang virus suốt đời.

Sức đề kháng của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi (nguồn: FAO)

Bệnh phẩm	Thời gian ASFV tồn tại
Thịt, xương dính thịt	105 ngày
Thịt muối	182 ngày
Thịt nấu chín (30 phút ở 70°C)	0
Thịt khô	300 ngày
Thịt hun khói	30 ngày
Thịt đông đá	1000 ngày
Thịt ướp lạnh	110 ngày
Nội tạng	105 ngày
Da /mỡ (làm khô)	300 ngày
Máu bảo quản ở 4°C	18 tháng
Phân ở nhiệt độ phòng (chuồng)	11 ngày
Máu thối rữa	15 tuần
Các ô chuồng bị nhiễm	1 tháng

- Virus có sức đề kháng cao, có thể tồn tại trong chất tiết, dịch tiết, trong xác động vật, trong thịt lợn và các chế phẩm từ thịt lợn như xúc xích, giăm bông, salami. Virus có khả năng chịu được nhiệt độ thấp, đặc biệt là trong các sản phẩm thịt lợn sống hoặc nấu ở nhiệt độ không cao nên virus có thể chịu được trong thời gian dài 3-6 tháng; virus có thể bị tiêu diệt ở 56°C trong 70 phút hoặc ở 60°C trong 20 phút. Virus sống trong máu đã phân hủy được 15 tuần; trong máu khô được 70 ngày; trong phân ở nhiệt độ phòng được 11 ngày; trong máu lợn ở 4°C trong 18 tháng; trong thịt dính xương ở 39°C được 150 ngày; trong giăm bông được 140 ngày và ở 50°C tồn tại trong 3 giờ.

Trong môi trường không có huyết thanh, virus có thể bị phá hủy ở pH <3,9 hoặc ở pH >11,5. Môi trường có huyết thanh, virus có thể tồn tại được ở pH = 13,4 trong 7 ngày.

Căn cứ thông tin về sức đề kháng của virus gây bệnh DTLCP, việc thiết lập danh mục sản phẩm động vật nhằm kiểm dịch nội địa và nhập khẩu tập trung riêng cho giai đoạn đang nỗ lực là cần thiết. Virus tồn tại lâu ở những sản phẩm cho dù đã qua chế biến sơ bộ như thịt muối, thịt xông khói... Những thông tin này có thể sẽ hữu ích trong quá trình truyền thông, tuyên truyền nhận thức về phòng chống dịch bệnh.

III. Phương thức truyền lây

- Virus DTLCP lây nhiễm thông qua tiếp xúc trực tiếp lợn ốm và lợn khỏe mạnh, qua đường tiêu hóa, qua sự tiếp xúc trực tiếp hoặc gián tiếp với các vật thể nhiễm virus như: chuồng trại, phương tiện vận chuyển, dụng cụ, đồ dùng, quần áo nhiễm virus và ăn thức ăn thừa lẫn thịt lợn nhiễm bệnh hoặc bị ve mềm cắn.

- Tại Trung Quốc, nghiên cứu dịch tễ của 68 ổ dịch đã chỉ ra rằng có 3 nguyên nhân chính làm bệnh DTLCP lây lan, bao gồm: 46% là do phương tiện vận chuyển và do con người không thực hiện vệ sinh, phun thuốc khử trùng tiêu độc; 34% là do sử dụng thức ăn dư thừa và 19% là do vận chuyển lợn sống và các sản phẩm của lợn giữa các vùng.

IV. Triệu chứng, bệnh tích của bệnh dịch tả lợn châu Phi

Bệnh DTLCP có đặc điểm gây chết lợn đột ngột. Lợn tất cả các lứa tuổi, tính biệt đều mắc bệnh. Lợn được tách đàn, ví dụ lợn mẹ và lợn con theo mẹ có thể không bị mắc bệnh vì mức độ lây nhiễm của bệnh DTLCP khá thấp. Thực tế, bệnh DTLCP có tỷ lệ gây chết cao nhưng ít lây nhiễm hơn so với các bệnh truyền lây qua biên giới khác như lở mồm long móng. Một số giống lợn bản địa châu Phi đã có thể kháng lại bệnh DTLCP ở một mức độ nhất định. Lợn hoang dã và lợn nuôi có biểu hiện bệnh tương tự nhau.

Biểu hiện lâm sàng do virus DTLCP gây ra rất khác nhau tùy thuộc vào nhiều yếu tố: độc lực của virus, giống lợn bị nhiễm bệnh, đường truyền lây, liều nhiễm và tình trạng lưu hành dịch tại khu vực. Về độc lực, virus DTLCP được chia thành 3 nhóm chính: nhóm độc lực cao, độc lực trung bình và độc lực thấp. Các thể bệnh DTLCP thay đổi từ thể quá cấp tính đến không biểu hiện triệu chứng. Các chủng độc lực cao gây bệnh quá cấp và cấp tính, các chủng độc lực trung bình gây bệnh thể cấp tính và á cấp tính. Các chủng độc lực thấp ở các vùng dịch địa phương gây những triệu chứng nhẹ và thỉnh thoảng liên quan đến bệnh thể cận lâm sàng hoặc mạn tính. Tỷ lệ mắc bệnh sẽ tùy thuộc vào chủng virus và đường truyền lây.

Mặc dù không biết chính xác, nhưng thời gian ủ bệnh trong tự nhiên dao động từ 4-19 ngày. Thời gian phát bệnh dao động từ dưới 7 ngày sau lây nhiễm, ở thể cấp tính, đến nhiều tuần, thậm chí nhiều tháng, ở thể mạn tính. Tỷ lệ chết tùy thuộc vào độc lực của virus, dao động từ 100% do chủng độc lực cao đến dưới 20% do chủng độc lực thấp gây ra. Ở thể mạn tính, bệnh có thể gây tử vong chủ yếu ở lợn mang thai và lợn con, lợn mắc bệnh kể phát hoặc bị suy yếu bởi lý do khác. Tỷ lệ sống sót sau khi nhiễm chủng virus độc lực cao ở những khu vực có dịch lưu hành là cao hơn do lợn đã thích nghi với chủng virus đó.

1. Triệu chứng

Virus DTLCP gây rất nhiều thể bệnh khác

nhau từ quá cấp, cấp tính đến mạn tính và mang trùng khỏe mạnh. Lợn bệnh biểu hiện các triệu chứng không khác biệt so với triệu chứng của bệnh dịch tả lợn cổ điển (đã và đang có tại Việt Nam). Do đó, việc chẩn đoán DTLCP khó có thể xác định và phân biệt được bằng các triệu chứng lâm sàng, cần lấy mẫu gửi phòng thí nghiệm để xét nghiệm phát hiện virus DTLCP.

Thể quá cấp tính (Peracute) là do virus độc lực cao, lợn chết nhanh, sốt cao 41 - 42 °C, chết đột ngột trong vòng 1-3 ngày trước khi có triệu chứng lâm sàng, thường không biểu hiện triệu chứng, bệnh tích rõ ràng. Thể quá cấp tính chủ yếu xuất hiện ở vùng bệnh xuất hiện lần đầu.

Thể cấp tính (Acute) là do virus có độc lực cao gây ra, lợn sốt cao (41-42°C). Trong 2-3 ngày đầu tiên, giảm bạch cầu và giảm tiểu cầu. Lợn

không ăn, lười vận động, ủ rũ, nằm chổng đống, lợn thích nằm chỗ có bóng râm hoặc gần nước. Lợn có biểu hiện đau vùng bụng, lưng cong, di chuyển bất thường, một số vùng da trắng chuyển sang màu đỏ, đặc biệt là ở vành tai, đuôi, cẳng chân, da phần dưới vùng ngực và bụng, có thể có màu sẫm xanh tím. Trong 1-2 ngày trước khi con vật chết, có triệu chứng thần kinh, di chuyển không vững, nhịp tim nhanh, thở gấp, khó thở hoặc có bọt lẫn máu ở mũi, viêm mắt, nôn mửa, tiêu chảy đôi khi lẫn máu hoặc có thể táo bón, phân cứng đóng viên có kích thước nhỏ, có chất nhầy và máu, da tím tái sau 24-48h. Lợn sẽ chết trong vòng 6-13 hoặc 20 ngày. Lợn mang thai có thể sảy thai ở mọi giai đoạn, tỷ lệ chết cao, lên tới 100%. Lợn khỏi bệnh hoặc nhiễm virus thể mạn tính thường không có triệu chứng, sẽ là vật chủ mang ASFV và bài thải virus ra môi trường.



Lợn nôn, nằm ủ rũ, chổng đống



Da chuyển đỏ ở tai



Da chuyển đỏ ở mông



Chảy máu hậu môn



Lợn cong lưng đau bụng

Thể á cấp tính (Subacute) gây ra bởi virus có độc tính trung bình. Chủ yếu được tìm thấy ở châu Âu, lợn biểu hiện triệu chứng

không nghiêm trọng. Lợn sốt nhẹ hoặc sốt lúc tăng lúc giảm, giảm ăn, sụt cân, ủ rũ, viêm toàn bộ phổi nên khó thở, ho có đờm,

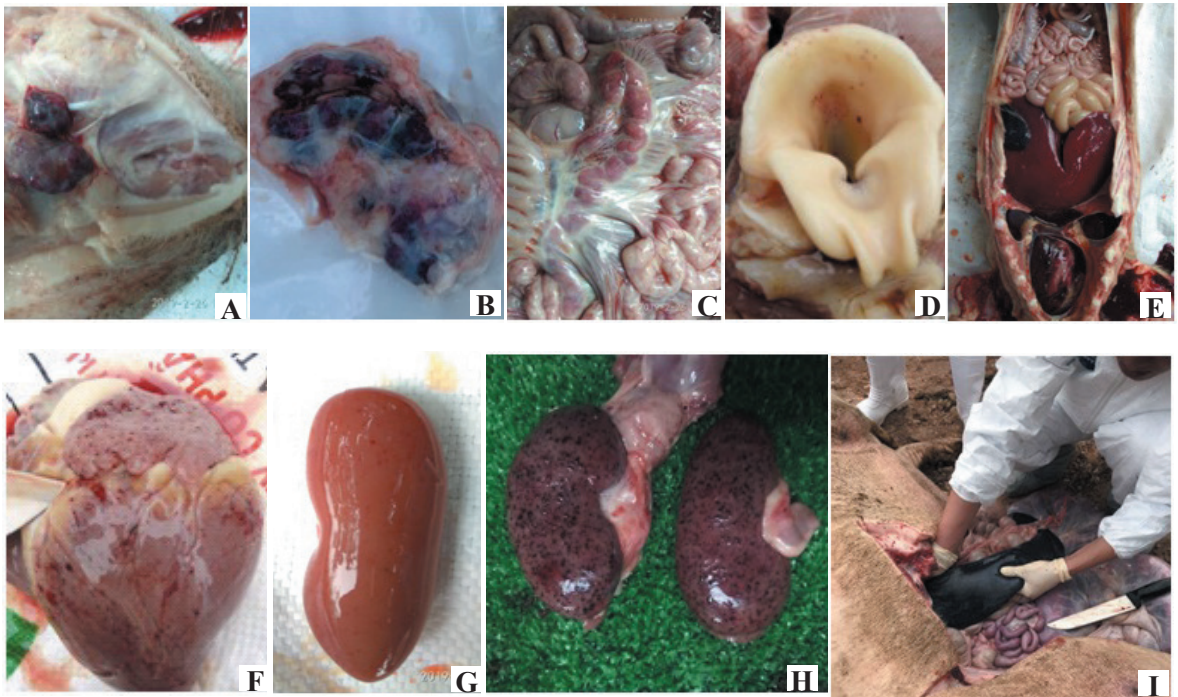
phổi có thể bội nhiễm vi khuẩn kế phát, viêm khớp, vận động khó khăn. Bệnh kéo dài 5-30 ngày, nếu máu ú trong tim (cấp tính hoặc suy tim) thì lợn có thể chết, lợn mang thai sẽ sảy thai, lợn chết trong vòng 15-45 ngày, tỷ lệ chết khoảng 30-70%. Lợn có thể khỏi hoặc bị bệnh mạn tính.

Thể mạn tính (Chronic form) gây ra bởi virus có độc tính trung bình hoặc thấp. Chủ yếu được tìm thấy ở Angola và châu Âu. Lợn có nhiều triệu chứng khác nhau, chẳng hạn như giảm cân, sốt không ổn định, có triệu chứng hô hấp, hoại tử da, hoặc viêm loét da mạn tính, viêm khớp, viêm cơ tim, viêm phổi dính sườn, viêm các khớp khác nhau trong giai đoạn phát triển. Triệu chứng kéo dài

2-15 tháng, có tỷ lệ tử vong thấp, lợn khỏi bệnh sau khi nhiễm virus sẽ trở thành dạng mạn tính.

2. Bệnh tích

Thể cấp tính: Xuất huyết nhiều ở các hạch lympho ở dạ dày, gan và thận. Thận có xuất huyết điểm, lá lách to có nhồi huyết. Da có màu tối và phù nề, da vùng bụng và chân có xuất huyết. Có nhiều nước xung quanh tim và trong xoang ngực hoặc xoang bụng, có các điểm xuất huyết trên nắp thanh quản, bàng quang và bề mặt các cơ quan bên trong; phù nề trong cấu trúc hạch lâm ba của đại tràng và phần tiếp giáp với túi mật, túi mật sưng.



A - B: Hạch sưng xuất huyết, C: Ruột xuất huyết, D: Nắp thanh quản xuất huyết, E: Nhiều dịch trong xoang cơ thể, F: Xung quanh tim, tim xuất huyết, G-H: Thận xuất huyết dính ghim, I: Lá lách sưng to

Thể mạn tính: Có thể gặp xơ cứng phổi hoặc có các ổ hoại tử hạch, hạch phổi sưng, viêm dính màng phổi.

V. Chẩn đoán phân biệt

Bệnh DTLCP không phải lúc nào cũng biểu hiện tất cả những triệu chứng lâm sàng như đã

đề cập ở trên. Chẩn đoán lâm sàng có thể gặp khó khăn trong giai đoạn sớm của bệnh hoặc khi có số lượng nhỏ động vật bị mắc bệnh. Chẩn đoán bệnh DTLCP thường mang tính phỏng đoán, vì các triệu chứng có thể nhầm lẫn với các bệnh khác. Hơn nữa, rất nhiều bệnh ở lợn có thể gây tỷ lệ tử vong tương tự như ở bệnh DTLCP cấp tính. Do vậy, không có chẩn đoán nào mang tính kết luận cho đến khi có kết quả xác nhận của phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, chẩn đoán phân biệt có ý nghĩa định hướng cho các xét nghiệm phòng thí nghiệm. Do vậy trong chẩn đoán phân biệt đối với bệnh DTLCP, cần xem xét một số bệnh sau:

1. Bệnh dịch tả lợn cổ điển (CSF)

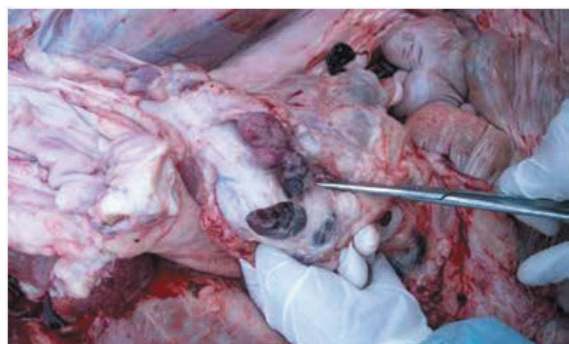
Chẩn đoán phân biệt quan trọng nhất đối với

bệnh DTLCP là bệnh dịch tả lợn cổ điển hay còn gọi là dịch tả lợn do một loại pestivirus thuộc họ *Flaviridae* gây ra. Giống như bệnh DTLCP, bệnh DTL cũng có nhiều thể bệnh lâm sàng khác nhau. Thể cấp tính có biểu hiện lâm sàng và tổn thương bệnh lý giống hệt thể cấp tính DTLCP và cũng đặc trưng bởi tỷ lệ tử vong cao. Các biểu hiện lâm sàng bao gồm sốt cao, bỏ ăn, ủ rũ, xuất huyết (ở da, thận, hạch amidan, bàng quang), viêm kết mạc, biểu hiện hô hấp, yếu, nằm co giật, da tím tái và chết trong vòng 2-10 ngày. Cách duy nhất để chẩn đoán phân biệt giữa 2 bệnh này là thông qua xét nghiệm phòng thí nghiệm. Không nên cố gắng tiêm phòng bệnh dịch tả lợn cho đến khi có kết quả xét nghiệm âm tính DTLCP vì bệnh DTLCP có thể dễ dàng lây lan rộng bởi những người không được tập huấn trong chiến dịch tiêm phòng.



A: Da tím tái, B: Hạch ruột sưng, xuất huyết, C: Lách nhồi huyết

2. Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS)



Hạch sưng, xuất huyết ở lợn nhiễm virus PRRS độc lực cao

Còn được gọi là bệnh tai xanh, PRRS được

đặc trưng bởi viêm phổi ở lợn vỗ béo và lợn thịt và sảy thai ở lợn nái. Bệnh thường kèm theo sốt, đỏ da và đặc biệt biến màu ở tai, đôi khi có tiêu chảy. Mặc dù tỷ lệ tử vong do PRRS không cao, nhưng các chủng virus PRRS độc lực cao đã làm suy giảm đàn lợn ở Trung Quốc, Việt Nam và Đông Âu trong những năm qua, liên quan đến tỷ lệ tử vong cao, sốt cao, thờ ơ, chán ăn, ho, khó thở và tím tái/xanh (ở tai, chân và đáy chậu). Bệnh tích bao gồm các tổn thương ở phổi (viêm phổi kẽ) và các tổ chức lympho (teo tuyến ức và sưng và xuất huyết ở hạch bạch huyết) và xuất huyết đình ghim ở thận.

3. Bệnh đóng dấu lợn

Bệnh này do vi khuẩn *Erysipelothrix*

rhusiopathiae gây ra, ảnh hưởng đến lợn ở mọi lứa tuổi và có khả năng ảnh hưởng đến lợn ở cả trang trại quy mô nhỏ và quy mô lớn có tính chất thương mại và tập trung. Bệnh có thể biểu hiện ở dạng cấp tính hoặc á cấp tính. Dạng cấp tính thường thấy ở lợn con, được đặc trưng bởi chết đột ngột, mặc dù tỷ lệ tử vong thường thấp hơn nhiều so với DTLCP. Sau 2 hoặc 3 ngày nhiễm bệnh, lợn có thể xuất hiện các tổn thương da hình kim cương rất đặc trưng liên quan đến viêm mạch hoại tử (mạch máu bị sưng viêm). Ở lợn trưởng thành, đây thường là biểu hiện lâm sàng duy nhất của bệnh. Giống như DTLCP cấp tính, lá lách có thể bị sưng huyết và to ra rõ rệt. Các tổn thương bệnh lý khác bao gồm sưng huyết ở phổi và hạch bạch huyết ngoại vi, cũng như xuất huyết ở vỏ thận, tim và viêm thanh dịch ở dạ dày. Phân lập vi khuẩn có thể xác nhận kết quả chẩn đoán và lợn đáp ứng tốt với điều trị penicillin. Những biến đổi vi thể của bệnh đóng dấu lợn khác với những biến đổi điển hình của DTLCP.



Tổn thương da hình kim cương đặc trưng của bệnh đóng dấu lợn

4. Bệnh Aujeszky

Bệnh Aujeszky, còn gọi là giả dại, gây ra các vấn đề sinh sản và thần kinh nặng ở động vật bị ảnh hưởng, thường dẫn đến tử vong. Mặc dù gần như tất cả các động vật có vú có thể bị nhiễm bệnh, lợn thường bị ảnh hưởng nhiều nhất và là vật chủ chứa virus. Động vật non bị ảnh hưởng nhiều nhất, với tỷ lệ tử vong đến 100% trong hai tuần đầu tiên. Lợn con thường bị sốt, ngừng ăn và có

dấu hiệu thần kinh (run rẩy, co giật, tê liệt) và thường chết trong vòng 24-36 giờ. Lợn lớn (hơn hai tháng tuổi) có thể có các triệu chứng tương tự, nhưng thường có dấu hiệu hô hấp và nôn, và ít khi tử vong. Lợn nái và lợn đực chủ yếu biểu hiện dấu hiệu hô hấp, nhưng lợn nái mang thai có thể sảy thai hoặc sinh ra lợn con yếu ớt, run rẩy. Tổn thương hoại tử điểm và viêm não xảy ra ở não, tiểu não, tủy thượng thận và nội tạng khác như phổi, gan hoặc lách. Ở thai nhi hoặc lợn con rất nhỏ, có các đốm trắng trên gan rất đặc trưng do nhiễm virus.



Lợn con biểu hiện thần kinh do mắc bệnh Aujeszky

5. Bệnh phó thương hàn (Salmonellosis)



Lợn mắc bệnh phó thương hàn có biểu hiện xanh tím ở tai

Lợn con thường là đối tượng bị ảnh hưởng. Nếu được điều trị kịp thời, con vật có thể đáp ứng với điều trị kháng sinh. Chẩn

đoán xác định là nuôi cấy phân lập vi khuẩn. Các triệu chứng giống với DTLCP bao gồm sốt, chán ăn, rối loạn hô hấp hoặc tiêu hóa và sung huyết khi giết mổ. Động vật có thể chết 3-4 ngày sau khi nhiễm bệnh. Lợn chết do bệnh Salmonellosis nhiễm trùng huyết có

biểu hiện xanh tím ở tai, chân, đuôi và bụng. Bệnh tích mổ khám bao gồm xuất huyết đỉnh ghim ở thận và trên bề mặt tim, lách to (nhưng có màu bình thường), sung hạch bạch huyết màng treo ruột, gan sưng to và phổi sung huyết.

Tóm tắt khác biệt biểu hiện lâm sàng ở một số bệnh lợn

Bệnh	Có vaccin	Sốt	Bỏ ăn	Mệt mỏi	Tổn thương da từ đỏ sang tím	Khó thở	Nôn	Tiêu chảy	Tiêu chảy có máu	Tỷ lệ chết cao	Chết đột ngột	Sảy thai	Khác biệt lâm sàng
DTLCP		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
DTL	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	Viêm kết mạc, mắt điều hòa. Có biểu hiện hệ thống thần kinh trung ương trong heo con, tư thế gập mình. Táo bón có thể tiến triển đến tiêu chảy màu vàng xám. Biểu hiện lâm sàng dài hơn.
Tai xanh	x	x	x	x	x	x	x			x		x	Cường độ suy hô hấp
Đóng dấu	x	x		x	x							x	Thường gặp ở lợn đạt trọng lượng xuất bán. Tổn thương da hình kim cương đặc trưng.
Phó thương hàn	x	x	x	x	x	x		x	x				Tiêu chảy màu vàng. Dấu hiệu hệ thần kinh trung ương bao gồm run, yếu, liệt và co giật.
Aujeszky	x	x	x	x		x						x	Biểu hiện khác nhau, phụ thuộc phần lớn vào tình trạng miễn dịch của con mẹ và tuổi của lợn bị ảnh hưởng. Hạ thân nhiệt, run rẩy và mất điều hòa, co giật. Viêm mũi và hắt hơi.

Tóm tắt khác biệt về tổn thương bệnh lý ở một số bệnh lợn

Bệnh	Lá lách mở rộng từ đỏ sẫm sang đen & bờ	Xuất huyết ở thận	Xuất huyết ở hạch lympho	Hạch lympho sưng to	Xuất huyết ở niêm mạc	Nhiều dịch trong xoang cơ thể và quanh tim	Viêm phổi	Khác biệt tổn thương bệnh lý
DTLCP	x	x	x	x	x	x	x	
DTL		x	x	x	x			Các nốt hoại tử hoặc “cúc áo” ở niêm mạc của đường tiêu hóa, nắp thanh quản và thanh quản. Viêm não. Lợn bị DTL giảm cân nhanh chóng. Màu nhợt nhạt ở rìa của lá lách.
Tai xanh		x	x	x				Viêm phổi kẽ. Không có lách sưng to. Teo tuyến ức.
Đóng dấu		x			x			Viêm khớp và viêm nội tâm mạc thực vật. Xuất huyết màng phổi và phúc mạc. Các hạch bạch huyết ngoại vi bị ảnh hưởng (chứ không phải dạ dày và thận).
Phó thương hàn		x					x	Viêm ruột và thỉnh thoảng viêm não. Viêm nội tâm mạc hoại tử. Hoại tử điểm như hạt kê trong gan. Không có các tổn thương mạch máu ở lách và hạch lympho.
Aujeszky							x	Tổn thương hoại tử điểm và viêm não xảy ra ở não, tiểu não, tuyến thượng thận và nội tạng khác như phổi, gan hoặc lách. Ở bào thai hoặc lợn con rất nhỏ, có các đốm trắng trên gan là đặc trưng của nhiễm bệnh do nhiễm virus. Viêm ruột hoại tử.

VI. Các phương pháp xét nghiệm phòng thí nghiệm

1. Lấy mẫu xét nghiệm

Lấy mẫu tại ổ dịch bệnh, nghi ổ dịch để xét nghiệm dịch bệnh:

- Chỉ nên lấy 3-5 mẫu tại một ổ dịch bệnh, nghi dịch bệnh. Đối với con lợn chết, nên lấy

mẫu là hạch lâm ba (Lympho) bên, hạch dưới hàm; hạn chế lấy phủ tạng (lách, thận...) để tránh mở phanh rộng gây ô nhiễm, lây nhiễm mầm bệnh ra môi trường.

Đối với lợn còn sống (đang ốm, sốt) sẽ lấy mẫu máu được chống đông bằng bổ sung EDTA 0,5%.

Nếu lấy mẫu huyết thanh để kiểm tra kháng

thể, nên lấy trong vòng 8-21 ngày sau khi lợn nhiễm bệnh.

- Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

Lấy mẫu giám sát dịch bệnh:

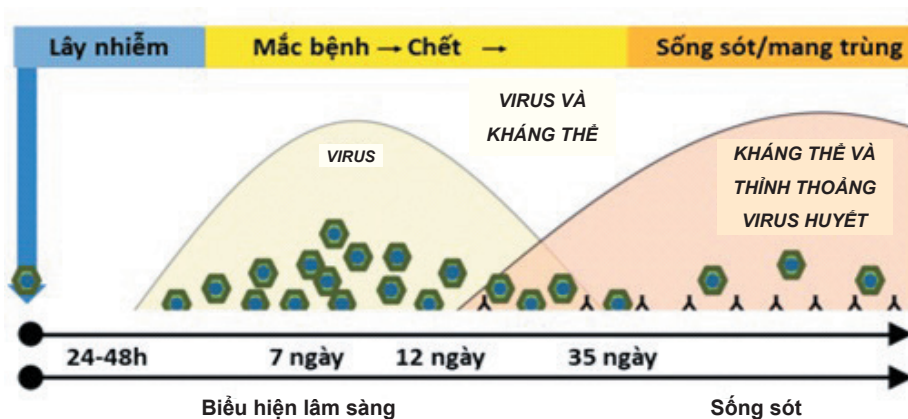
Lấy mẫu máu chống đông, số lượng theo quy định hiện hành về kiểm dịch, kiểm soát dịch bệnh.

2. Chẩn đoán phòng thí nghiệm bệnh Dịch tả lợn châu Phi

Bệnh DTLCP không có vacxin phòng bệnh, do đó việc phát hiện sớm và chính xác bệnh rất quan trọng để áp dụng các biện pháp vệ sinh nghiêm ngặt và kiểm soát an ninh sinh học nhằm ngăn ngừa sự lây lan của bệnh. Chẩn đoán bệnh DTLCP có nghĩa là xác định các con vật đã từng bị hoặc đang bị nhiễm virus DTLCP. Bởi vậy, chẩn đoán phù hợp phải bao

gồm việc phát hiện và định danh các kháng nguyên hoặc DNA và kháng thể đặc hiệu virus DTLCP nhằm hỗ trợ các thông tin hữu ích cho các chương trình khống chế và thanh toán dịch bệnh. Khi lựa chọn phương pháp xét nghiệm, cần chú ý xem xét đến diễn biến của bệnh. Mỗi con vật có thể ở các giai đoạn bệnh khác nhau, do đó xét nghiệm virus và kháng thể nên được tiến hành ở các ổ dịch và trong các chương trình khống chế và thanh toán dịch bệnh.

Thời gian ủ bệnh do lây nhiễm tự nhiên được báo cáo khác nhau, dao động từ 4-19 ngày. Khoảng 2 ngày trước khi xuất hiện triệu chứng, lợn nhiễm virus DTLCP bắt đầu bài thải lượng lớn virus. Bài thải virus có thể khác nhau tùy thuộc vào độc lực của chủng virus DTLCP gây bệnh. Sự đáp ứng kháng thể xảy ra từ 7-9 ngày sau lây nhiễm và sau đó kháng thể có thể phát hiện được ở cả đời lợn.



CÁC GIAI ĐOẠN SAU KHI NHIỄM VIRUS DTLCP Ở LỢN

Kết quả xét nghiệm dương tính virus (kháng nguyên) cho biết lợn được xét nghiệm đang nhiễm bệnh trong thời gian lấy mẫu. Trái lại, kết quả xét nghiệm dương tính kháng thể DTLCP nói lên lợn được xét nghiệm đang nhiễm bệnh

hoặc đã từng bị nhiễm bệnh và đã phục hồi (và có thể có kháng thể cả đời).

Từ năm 2015, các kết quả xét nghiệm huyết thanh học trên quần thể lợn hoang dã ở Đông Âu

cho thấy một số lợn có thể phục hồi sau khi nhiễm virus DTLCP và trong một số trường hợp nhất định, vẫn duy trì tình trạng nhiễm bệnh cận lâm sàng. Do đó xét nghiệm kháng thể có thể cung cấp được những thông tin cần thiết cho các chương trình khống chế và thanh toán bệnh DTLCP.

2.1. Xét nghiệm virus

2.1.1. Phương pháp PCR

Phương pháp PCR sử dụng để phát hiện gen của virus DTLCP trong mẫu lợn (máu, huyết thanh, phủ tạng...). Các mảnh DNA của virus được phản ứng PCR khuếch đại tới mức có thể phát hiện được. Các xét nghiệm PCR chuẩn cho phép phát hiện DNA của virus sớm, thậm chí trước khi con vật có biểu hiện triệu chứng lâm sàng. Phương pháp PCR có thể cho kết quả xét nghiệm trong vài giờ sau khi mẫu tới phòng thí nghiệm. Độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp PCR không thua kém so với phương pháp phân lập virus. Phương pháp PCR cho độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn hẳn so với các phương pháp phát hiện kháng nguyên khác như Ag/ELISA và FAT. Tuy nhiên độ cực nhạy cũng khiến cho phương pháp PCR dễ bị sai lệch do tạp nhiễm chéo. Vì vậy các kỹ thuật chống tạp nhiễm phải được áp dụng triệt để để giảm thiểu và kiểm soát rủi ro này.

Các phương pháp PCR thường (Aguero et al., 2003) và Realtime PCR (King et al., 2003) theo khuyến cáo của OIE (2016) đã được đánh

giá đầy đủ trong thời gian dài và là những công cụ hữu ích cho công tác chẩn đoán thường quy đối với bệnh DTLCP. Nhiều quy trình Realtime PCR khác (Fernández-Pinero et al., 2012 và Tignon et al., 2011) đã chứng minh có độ nhạy cao hơn so với các quy trình do OIE khuyến cáo trong việc phát hiện gen virus DTLCP ở lợn mang trùng. Các bộ môi và mẫu dò sử dụng cho các kỹ thuật phân tử này được thiết kế dựa trên vùng gen P72, là vùng gen có tính ổn định cao của virus DTLCP và đã được nghiên cứu nhiều. Hầu hết các chủng virus thuộc 22 genotype có gen P72 đã biết đều có thể phát hiện được bằng các phương pháp PCR này, thậm chí ở cả những mẫu vô hoạt hoặc thoái hóa.

PCR là phương pháp được lựa chọn cho những trường hợp bệnh DTLCP quá cấp, cấp tính, á cấp tính. Hơn nữa, vì PCR phát hiện gen của virus, nên nó vẫn phát hiện được dấu vết của virus kể cả khi không phân lập được virus sống và là công cụ rất hữu ích để phát hiện DNA của virus DTLCP ở lợn bị nhiễm với các chủng virus DTLCP có độc lực trung bình cho đến thấp. Mặc dù PCR không cho biết thông tin về lây nhiễm nhưng nó có thể cho biết thông tin về định lượng của virus.

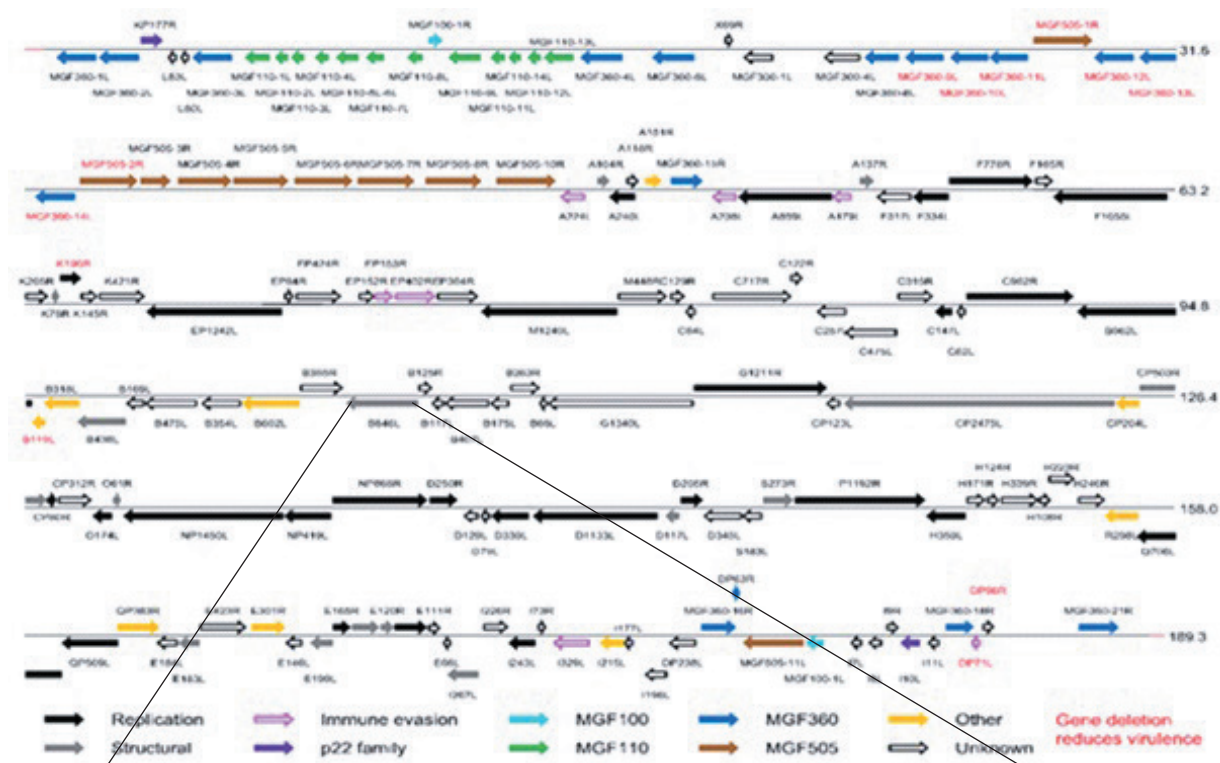
Phương pháp Realtime PCR phát hiện virus DTLCP theo OIE (King et al., 2003)

Đoạn môi và mẫu dò được thiết kế dựa trên vùng ổn định của gen P72 như sau:

Trình tự đoạn môi và mẫu dò

STT	Tên	Trình tự
1	Môi xuôi ASFV	5'-CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA-3'
2	Môi ngược ASFV	5'-GATACCACAAGATCRGCCGT-3'
3	Đoạn dò ASFV	5'- FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-TAMRA-3'

Sơ đồ gen của virus DTLCP (Alonso et al., 2018)



Bộ primer và probe của phương pháp Realtime PCR (King, 2003) xuôi được thiết kế dựa trên vùng ổn định của gen P72 của virus DTLCP nhằm vào đoạn sản phẩm 250bp

```

GCAGAGATAAGCTTTCAGGATAGAGATACAGCTCTTCCAGACGCATGTTTCATCTATATCTGATAT
TAGCCCCGTTACGTATCCGATCACATTACCTATTATTAAAAACATTTCCGTAACTGCTCATGGTATC
FW Primer →
AATCTTATCGATAAAATTTCCATCAAAGTTCTGCAGCTCTTACATACCCCTTCCACTACGGAGGCAAT
GCGATTAAAACCCCCGATGATCCGGGTGCGATGATTACCTTTGCTTTGAAGCCACGGGAG
GAATACCAACCCAGTGGTTCATATTAACGTATCCAGAGCAAGAGAATTTTATATTAGTTGGGACAC
Probe
GGATTACGTGGGGTCTATCACTACGGCTGATCTTGTTGGTATCGGCATCTGCTATTAAC
← RV primer
  
```

Đoạn gen P72 của virus DTLCP thu thập được từ ổ dịch Hưng Yên ngày 1/2/2019

+ Master mix và mẫu

Chuẩn bị Master mix cho phản ứng Realtime PCR

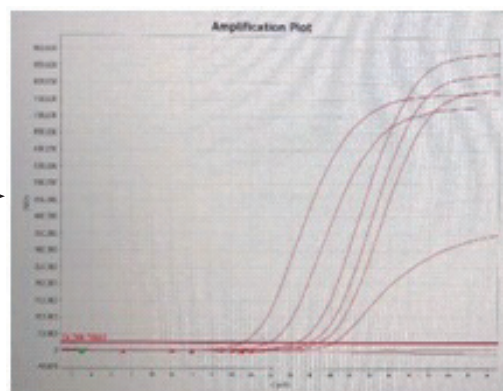
phát hiện virus DTLCP theo kit Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG, Cat.No: 11730-017.

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích cho 1 phản ứng (μl)
1	Nước không có RNA/DNA		5,5
2	Dung dịch SuperMix		12,5
3	Mồi xuôi ASFV	20 μM	0,5
4	Mồi ngược ASFV	20 μM	0,5
5	Đoạn dò ASFV	6 μM	1
	Tổng thể tích dung dịch đệm thực hiện phản ứng		20
6	Mẫu DNA		5
	Tổng thể tích dung dịch thực hiện phản ứng		25

Sau khi chuẩn bị xong, đưa các ống PCR có chứa master mix và mẫu vào máy PCR để chạy phản ứng theo chu kỳ luân nhiệt sau:

Cài đặt chu kỳ luân nhiệt và chạy phản ứng Realtime PCR

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
50°C	2 phút (*)	1
95°C	2 phút (*)	1
95°C	15 giây	
60°C	60 giây (Ghi nhận tín hiệu quang ở bước này)	45



Máy Realtime PCR và kết quả phản ứng Realtime PCR, các mẫu dương tính xuất hiện đường cong khuếch đại

+ Đọc kết quả:

Kết quả của phản ứng Realtime PCR

được xác định dựa vào chu kỳ ngưỡng (Cycle threshold: Ct).

- Mẫu có giá trị $Ct < 40$ được xem là dương tính

- Mẫu không có giá trị Ct là âm tính

- Mẫu có giá trị Ct trong khoảng $40 \leq Ct \leq 45$ được xem là nghi ngờ. Những mẫu nghi ngờ này cần được thực hiện lại xét nghiệm hoặc sử dụng phương pháp xét nghiệm tương đương khác để khẳng định kết quả.

Những điểm chú ý đối với phương pháp PCR

Vì phương pháp PCR có độ nhạy rất cao, nên điều chú ý nhất trong suốt quá trình thực hiện là nguy cơ tạp nhiễm chéo và kết quả dương tính giả có thể xảy ra trong tình huống này. Sự tạp nhiễm có thể do chính virus DTLCP có trong mẫu hoặc trong đối chứng dương được đưa vào chiết tách DNA, cũng có thể do DNA virus của lần khuếch đại PCR trước. Vì vậy nhân viên thực hiện xét nghiệm PCR cần phải tuân thủ nghiêm ngặt các nội quy làm việc để giảm thiểu nguy cơ tạp nhiễm:

- Tất cả các công đoạn của phương pháp PCR phải được thực hiện ở các khu vực riêng rẽ, sử dụng thiết bị, dụng cụ riêng: như khu chuẩn bị mẫu, khu chiết tách DNA, khu chuẩn bị hỗn hợp PCR và khu vực loại bỏ sản phẩm PCR.

- Nhân viên xét nghiệm phải luôn sử dụng găng tay sạch trong các khu vực PCR.

- Bất cứ khi nào di chuyển sang khu vực PCR khác, nhân viên xét nghiệm phải bỏ găng tay cũ và đi găng tay mới.

- Vật tư phải được sử dụng riêng cho từng công đoạn PCR.

- Luôn sử dụng đầu tip mới cho các mẫu khác nhau.

- Không được mở các ống chứa sản phẩm PCR ở các phòng PCR khác ngoài khu vực phân tích điện di.

2.1.2. Phương pháp phân lập

Phân lập virus được thực hiện bằng cách cấy mẫu bệnh phẩm lên môi trường tế bào sơ cấp có

nguồn gốc từ lợn như tế bào bạch cầu đơn nhân, đại thực bào. Nếu mẫu có virus DTLCP, chúng sẽ nhiễm, nhân lên trong các tế bào mẫn cảm và gây bệnh tích tế bào (CPE) ở các tế bào bị nhiễm. Phần lớn các chủng virus DTLCP có thể gây phản ứng hấp phụ hồng cầu do các tế bào hồng cầu lợn có tính chất bám vào các tế bào nhiễm virus DTLCP. Tính chất này đặc hiệu cho virus DTLCP vì không có loại virus nào khác ở lợn gây hấp phụ hồng cầu trên môi trường tế bào. Do vậy khi gây nhiễm tế bào, một lượng hồng cầu lợn được cho vào để tạo phản ứng hấp phụ hồng cầu. Hiện tượng hấp phụ hồng cầu là sự bám gắn của nhiều tế bào hồng cầu lợn lên tế bào bị nhiễm virus tạo nên hình hoa hồng.

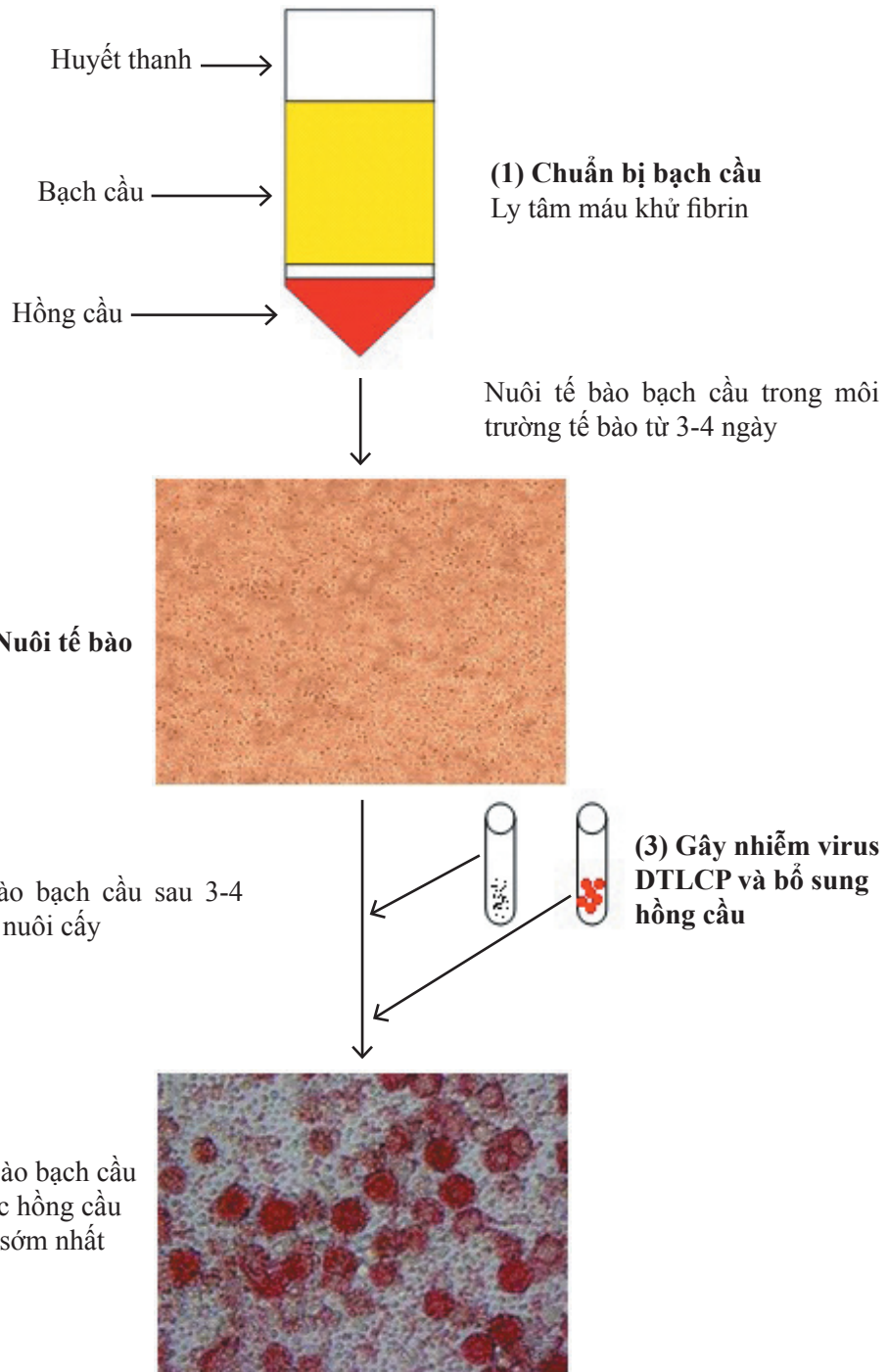
Tuy nhiên trong một số trường hợp không xuất hiện hấp phụ hồng cầu, cần chú ý CPE có thể do độc tố tế bào bắt nguồn từ mẫu, do các loại virus khác như Aujeszky's disease hay chủng virus DTLCP không gây hấp phụ hồng cầu. Trong những trường hợp này, cần sử dụng các phương pháp phát hiện kháng nguyên khác như FAT hoặc PCR để xác chẩn. Nếu kết quả FAT và PCR vẫn âm tính, sử dụng dịch nuôi cấy để cấy chuyển sang môi trường tế bào mới và tiếp đời 3-5 lần để kiểm tra lại chắc chắn không có virus DTLCP.

Những điểm chú ý đối với phương pháp phân lập

- Phương pháp này tốn nhiều thời gian và công sức. Để có kết quả chẩn đoán DTLCP đúng, phương pháp này tốn 5-10 ngày nếu phản ứng hấp phụ hồng cầu xảy ra ngay trong lần gây nhiễm đầu tiên. Nếu việc chẩn đoán không thể đợi đến 15-30 ngày, phương pháp này không được khuyến cáo để sử dụng cho chẩn đoán ban đầu. Phương pháp này có thể sử dụng để xác chẩn kết quả của các phương pháp PCR và phương pháp miễn dịch huỳnh quang gián tiếp.

- Sự xuất hiện bệnh tích tế bào mà không có phản ứng hấp phụ hồng cầu có thể do sự có mặt của các loại virus khác, do độc tố hoặc do virus DTLCP không gây hấp phụ hồng cầu. Điều này khiến cho việc chẩn đoán đúng bệnh DTLCP

CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH PHÂN LẬP



gặp khó khăn và cần xác chẩn lại bằng phương pháp PCR.

- Phương pháp này cần sử dụng hồng cầu và

huyết thanh từ cùng con vật cung cấp bạch cầu làm tế bào để tránh hiện tượng hấp phụ hồng cầu không đặc hiệu.

- Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng mẫu bảo quản kém dễ gây ra phản ứng sai lệch và không phân lập được virus. Các mẫu phải được bảo quản lạnh trong quá trình vận chuyển và lưu giữ.

- Phương pháp này đòi hỏi phòng thí nghiệm phải có kỹ thuật tể bào và phòng nuôi động vật.

2.1.3. Phương pháp miễn dịch huỳnh quang trực tiếp (DIF)

Phương pháp DIF được sử dụng để phát hiện virus DTLCP trong mô của lợn nghi nhiễm bệnh. Nguyên tắc của phương pháp này là sử dụng kính hiển vi để phát hiện kháng nguyên virus trong tiêu bản smear hoặc tiêu bản cắt lạnh các tổ chức của lợn nghi nhiễm bệnh. Các kháng nguyên trong tế bào được các kháng thể đặc hiệu gắn huỳnh quang phát hiện. Các hạt hoặc thể vùi màu huỳnh quang xuất hiện trong tế bào chất của tế bào nhiễm bệnh. Phương pháp DIF cũng có thể sử dụng để phát hiện kháng nguyên virus DTLCP trong môi trường tế bào bạch cầu mà không có hiện tượng hấp phụ hồng cầu và có thể dùng để nhận diện những chủng virus không gây hấp phụ hồng cầu. Nó cũng có thể phân biệt được CPE của virus DTLCP và của các virus khác như Aujeszky hoặc độc tố.

DIF là phương pháp có độ nhạy cao đối với các trường hợp quá cấp và cấp tính. Tuy nhiên ở những trường hợp á cấp tính và mạn tính, DIF có độ nhạy giảm đáng kể (40%), điều này liên quan đến sự có mặt của các phức hợp kháng nguyên – kháng thể trong mô lợn bệnh đã ngăn không cho phản ứng giữa kháng nguyên và kháng thể (conjugate) xảy ra.

2.1.4. Phương pháp ELISA kháng nguyên

Kháng nguyên virus cũng có thể phát hiện được bằng phương pháp ELISA, nhưng nó chỉ được khuyến cáo sử dụng đối với các thể bệnh cấp tính. Tương tự như phương pháp DIF, phương pháp ELISA kháng nguyên có độ nhạy giảm đáng kể. Điều này có thể là do phức hợp kháng nguyên – kháng thể trong mô lợn bệnh

đã làm cho sự tương tác giữa kháng nguyên và kháng thể giảm. Do vậy, phương pháp ELISA kháng nguyên chỉ được khuyến cáo sử dụng như là phương pháp xét nghiệm cho đàn và sử dụng kết hợp với các phương pháp xét nghiệm kháng nguyên khác.

2.2. Xét nghiệm kháng thể

Xét nghiệm kháng thể được khuyến cáo cho các thể bệnh á cấp tính và mạn tính, cũng như cho các chương trình thanh toán và xét nghiệm quy mô lớn vì nhiều lý do như sau:

- Kháng thể thường được sản sinh nhanh chóng ở lợn nhiễm bệnh. Ở những lợn này, kháng thể có thể phát hiện được trong mẫu huyết thanh từ lợn sau nhiễm từ 7-10 ngày.

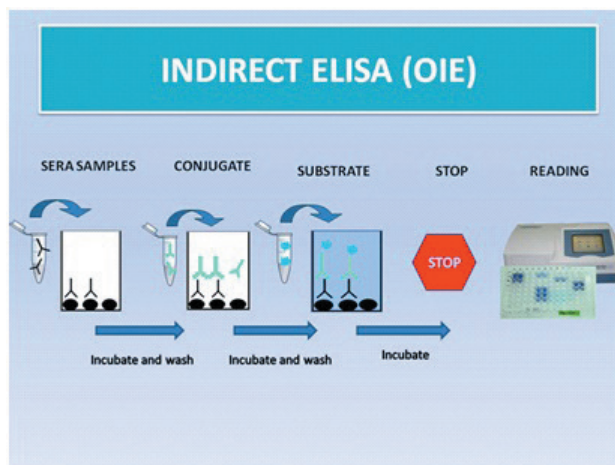
- Vacxin chưa sẵn có cho bệnh DTLCP, điều này có nghĩa rằng kháng thể đặc hiệu virus DTLCP chỉ do nhiễm bệnh.

- Ở lợn phục hồi sau nhiễm bệnh, các kháng thể đặc hiệu có thể phát hiện được trong nhiều tháng và thậm chí cả đời đối với một số lợn.

2.2.1. Phương pháp ELISA

Phương pháp ELISA là phương pháp rất hữu ích được sử dụng rộng rãi để chẩn đoán huyết thanh của nhiều bệnh động vật khác nhau. Một số tính chất nổi bật nhất của phương pháp này là các chỉ số về độ nhạy và độ đặc hiệu cao, tốc độ nhanh và chi phí thấp. Các quần thể động vật lớn có thể được xét nghiệm trong thời gian ngắn nhờ các thiết bị tự động có sẵn ngày nay. Kỹ thuật này cũng cho phép đọc kết quả dễ dàng.

Kỹ thuật được sử dụng nhiều hơn để phát hiện kháng thể DTLCP chính là ELISA, kỹ thuật này dựa vào các kháng thể hay kháng nguyên có gắn enzyme, vì vậy cộng hợp (conjugate) này vừa có hoạt động kháng thể và enzyme. Là thành phần (kháng nguyên hoặc kháng thể) có gắn enzyme và không hòa tan, phản ứng kháng nguyên - kháng thể sẽ được cố định và dễ dàng phát triển bằng việc cho thêm cơ chất (substrate) để có thể đọc được bằng máy quang phổ kế.



Trình tự các bước trong phản ứng ELISA gián tiếp phát hiện kháng thể bệnh DTLCP

Phương pháp ELISA gián tiếp được OIE (2012) khuyến cáo sử dụng để phát hiện kháng thể bệnh DTLCP. Kỹ thuật này đã được đánh giá đầy đủ qua thời gian với độ nhạy và độ đặc hiệu lên tới 95,8% và 97,3%. Phương pháp này có thể xét nghiệm số lượng mẫu lớn trong thời gian ngắn.

ELISA gián tiếp trên sử dụng các kháng nguyên bán thuần khiết, hòa tan trong bào tương từ môi trường nuôi cấy virus DTLCP. Chủng virus sử dụng cho sản xuất kháng nguyên là chủng virus Tây Ban Nha, phân lập năm 1970 (E70) và đã thích nghi phát triển trên một dòng tế bào ổn định của khí (MS cell line). Kháng nguyên được cố định trong đĩa ELISA. Mẫu có kháng thể DTLCP sẽ nhận diện kháng nguyên để bám vào và hình thành nên phức hợp kháng nguyên – kháng thể. Sau đó, cộng hợp được cho vào và tìm đến phức hợp kháng nguyên – kháng thể để cố định vào. Đĩa ELISA sau đó được rửa nhiều lần bằng các dung dịch đệm, tất cả những thành phần trong đĩa không được cố định sẽ bị loại bỏ. Sau đó cơ chất được thêm vào để đọc kết quả: những giếng nào có phát màu là có kháng thể DTLCP. Tuy nhiên cần sử dụng máy ELISA đo mật độ quang học (OD) để cho kết quả chính xác.

Những điểm cần chú ý

Mặc dù phương pháp ELISA gián tiếp của OIE đã được chứng minh có độ nhạy và đặc hiệu

để phát hiện kháng thể DTLCP, nhưng phương pháp này vẫn có những điểm cần chú ý:

- Huyết thanh không được bảo quản tốt có thể gây ra phản ứng dương tính giả vì kháng thể của những huyết thanh này bám vào các giếng trong đĩa ELISA dưới dạng không đặc hiệu, gây ra kết quả dương tính giả, thậm chí không có kháng nguyên được cố định trong đĩa. Những huyết thanh được xét nghiệm bằng các phương pháp tham chiếu khác như Immunoblotting hay miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (Immunoperoxidase). Mặc dù những trường hợp dương tính giả trong chẩn đoán là rất thấp nhưng sự cẩn thận trong việc thu thập và bảo quản mẫu cần hết sức được chú ý. Trong trường hợp không có điều kiện bảo quản mẫu tốt, khả năng gây dương tính giả cần được xem xét khi phân tích mẫu bằng phương pháp ELISA gián tiếp.

- Loại đĩa sử dụng để phủ kháng nguyên: chất liệu nhựa của đĩa rất quan trọng đối với độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp. Các nghiên cứu ở châu Âu đã cho thấy phương pháp này có độ nhạy tốt nhất khi sử dụng đĩa Polysorp 96 wells của hãng Nunc.

- Loại cộng hợp (conjugate): các nghiên cứu ở châu Âu cũng chứng minh rằng loại cộng hợp cũng rất quan trọng đối với độ nhạy của phương

pháp ELISA. Sử dụng cộng hợp có Peroxidase của hãng PIERCE, làm tăng độ nhạy của ELISA.

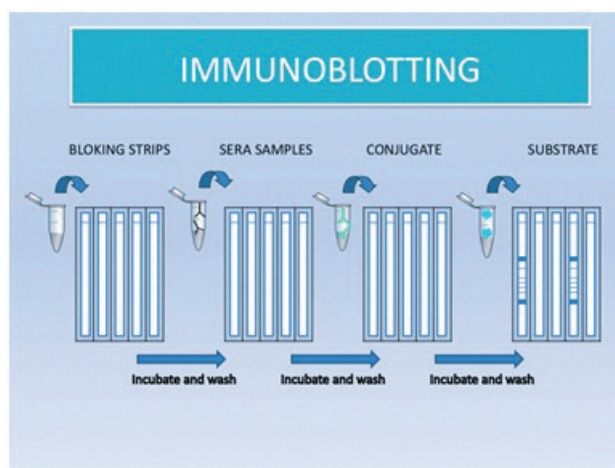
2.2.2. Phương pháp immunoblotting (IB)

IB là một xét nghiệm nhanh và nhạy để phát hiện và phân tích protein bằng cách sử dụng tính đặc hiệu vốn có trong nhận diện kháng nguyên – kháng thể. Nó bao gồm quá trình hòa tan, tách điện di, và chuyển các protein lên màng (thường là màng nitrocellulose). Màng được phủ kháng thể thứ nhất đặc hiệu với mục tiêu đích và với kháng thể thứ 2 có đánh dấu.

Để chuẩn bị các test IB xét nghiệm kháng thể DTLCP, các protein của virus DTLCP được phân tách bằng điện di trên SDS-PAGE, rồi chuyển lên màng lọc nitrocellulose với cường độ dòng điện không đổi. Sau đó màng lọc được cắt thành

các băng nhỏ và được làm bão hòa các vị trí bám protein còn lại. Sau khi làm bão hòa, huyết thanh được đưa lên băng kháng nguyên để kháng thể phản ứng với kháng nguyên. Để đọc kết quả, cộng hợp protein A (conjugate) peroxidase và cơ chất 4-chloro-1-naphtol được tiếp tục cho vào, trong trường hợp mẫu có kháng thể đặc hiệu virus DTLCP, phản ứng peroxidase sẽ được nhìn thấy.

Phương pháp IB được OIE (2012) khuyến cáo sử dụng để xác chẩn các mẫu dương tính hay nghi ngờ bằng ELISA và trong trường hợp mẫu được bảo quản không đúng hoặc bảo quản kém. Kỹ thuật này đã được đánh giá đầy đủ và có độ nhạy và độ đặc hiệu 98%. Phương pháp này cho phép phát hiện những con vật nhiễm bệnh mà không biểu hiện triệu chứng lâm sàng.



Các bước thực hiện phản ứng immunoblotting (IB)

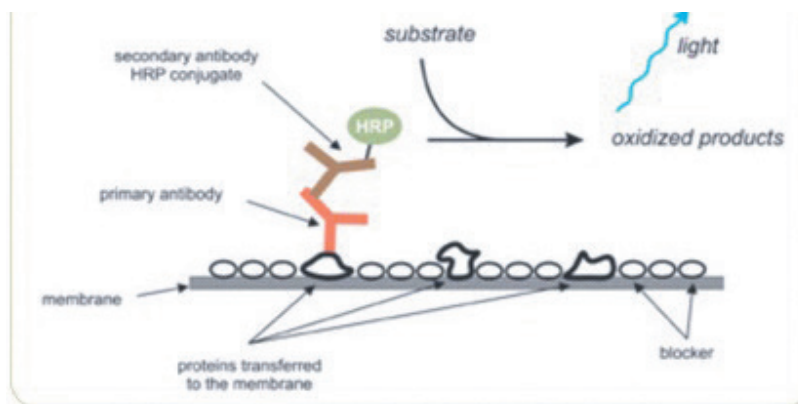
Những điểm cần chú ý:

Trong những năm qua, rất nhiều mẫu huyết thanh đã được xét nghiệm bằng phương pháp IB và cho kết quả tốt, nhưng có một số điểm cần cân nhắc:

- Phản ứng dương tính giả: huyết thanh từ động vật đã tiêm vaccin với các bệnh khác có thể bị dương tính giả do phản ứng với các protein tế bào có mặt trong băng IB chuẩn bị với virus

DTLCP bán thuần khiết. Trong những trường hợp này, huyết thanh cần phải được xét nghiệm bằng các phương pháp khác như Immunoperoxidase gián tiếp hoặc Immunofluorescence gián tiếp.

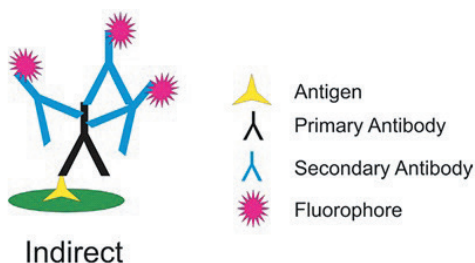
- Loại cộng hợp (conjugate): các nghiên cứu ở châu Âu cũng chứng minh rằng loại cộng hợp cũng rất quan trọng đối với độ nhạy của phương pháp. Protein A peroxidase conjugated được khuyến cáo sử dụng.



Phản ứng immunoblotting trên băng kháng nguyên DTLCP

2.2.3. Phương pháp miễn dịch huỳnh quang (immunofluorescence) gián tiếp

Phương pháp miễn dịch huỳnh quang gián tiếp là phương pháp chẩn đoán huyết thanh học. Trong phương pháp này, độ nhạy của kỹ thuật vi thể và độ đặc hiệu của kỹ thuật miễn dịch được kết hợp. Phương pháp này sử dụng cộng hợp (conjugate) gắn huỳnh quang kháng IgG trong huyết thanh mẫu.



Sự tương tác của các thành phần trong phản ứng miễn dịch huỳnh quang gián tiếp

V. Khuyến nghị công tác chẩn đoán xét nghiệm bệnh Dịch tả lợn châu Phi

- Hiện nay chưa có vaccin và thuốc điều trị được DTLCP, vì vậy đối với người chăn nuôi, giải pháp chăn nuôi an toàn sinh học, thực hiện các biện pháp phòng bệnh tổng hợp, đồng bộ, là giải pháp hữu hiệu duy nhất hiện nay đối với phòng, chống bệnh DTLCP.

- Đàn lợn khi phát hiện nghi nhiễm, mắc bệnh

DTLCP cần lấy mẫu và gửi đến các Phòng thí nghiệm uy tín để xét nghiệm xác định nguyên nhân bệnh, nếu xác định dương tính, không thực hiện điều trị lợn bệnh, lợn nghi mắc bệnh; cần báo cáo ngay chính quyền địa phương và thú y cơ sở để tiêu hủy sớm toàn bộ đàn lợn, thực hiện vệ sinh, khử trùng tiêu độc, áp dụng các biện pháp an toàn sinh học.

- Đối với kiểm dịch vận chuyển, cần lấy mẫu xét nghiệm theo quy định trong thông tư 07/2016/TT-BNNPTNT. Tuy nhiên cần đề nghị các cơ quan chức năng cho phép xét nghiệm mẫu gộp (tối đa 5 mẫu) để giảm chi phí.

- Để xác định bệnh DTLCP hiện nay ở Việt Nam, cần áp dụng các phương pháp xét nghiệm kháng nguyên. Các phương pháp xét nghiệm kháng thể không có ý nghĩa nhiều trong giai đoạn này ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alonso, C., Borca, M., Dixon, L., Revilla, Y., Rodriguez, F., Escibano, J.M., and ICTV Report Consortium. 2018, ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae, Journal of General Virology, 99: 613–614
2. Beltrán-Alcrudo, D., Arias, M., Gallardo, C., Kramer, S. & Penrith, M.L. 2017. *African swine fever: detection and diagnosis – A manual for veterinarians*. FAO Animal Production and Health Manual No. 19. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/.

Trao đổi KHKT - Hoạt động ngành

KHI NÀO CHÚNG TA CÓ VACCIN PHÒNG BỆNH DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI – ASF

GS Fernando Rodríguez (Tây Ban Nha), Giám đốc CReSA

GS. Fernando Rodríguez (Giám đốc CReSA - Tây Ban Nha), giải thích về giai đoạn có thể có vaccin phòng bệnh ASF.



GS. Fernando Rodríguez

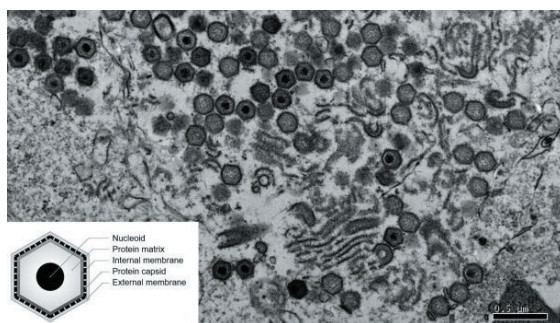
Tại sao chưa có vaccin phòng bệnh dịch tả lợn châu Phi (ASF)?



ASF là một căn bệnh hầu như bị lãng quên, đặc biệt là nếu chúng ta nghĩ ở các khu vực thuộc Tiểu vùng châu Phi, nơi virus vẫn còn lưu hành kể từ khi phát sinh nguồn gốc của nó, góp phần vào tình trạng nghèo đói và suy dinh dưỡng ở các khu vực bị ảnh hưởng. Ngay cả khi căn bệnh trở nên phổ biến ở châu Âu, chưa bao giờ có hơn một chục nhóm nghiên cứu quan tâm đến chủ đề này, với Tây Ban Nha và Bồ Đào Nha là những quốc gia có nhiều nhà nghiên cứu quan tâm về bệnh hơn. Do đó, không có gì lạ khi trong hơn 60 năm qua chúng ta biết về loại virus này, chỉ có 1.454 bài viết về ASF và 167 bài

viết về vaccin và ASF đã được xuất bản.

Câu hỏi đầu tiên mà chúng ta phải đặt ra là: Tại sao chúng ta ngạc nhiên rằng chúng ta chưa có vaccin chống lại ASF? Ngăn chặn để ngăn chặn: đó nên là phương châm của chúng ta cho tương lai?



Hình ảnh điện tử của tế bào bị nhiễm virus ASF

Bản thân virus ASF rất phức tạp, giống như chu kỳ dịch tễ học của nó, có nhiều hơn một vật chủ dễ mắc bệnh: lợn và lợn rừng ở châu Âu, với tình hình ở châu Phi phức tạp hơn nhiều, bởi vì có hai ổ chứa tự nhiên: ve *Ornithodoros* và lợn rừng.

Tuy nhiên, và đây là một đánh giá hoàn toàn cá nhân, điều khiến nó thậm chí còn phức tạp hơn là việc chúng ta không thể nghiên cứu đề tài này một cách vững chắc và phối hợp với việc đóng cửa các phòng thí nghiệm tốt nhất vào thời điểm đó (đầu năm 2000), bởi vì coi như virus không còn là mối đe dọa nữa. Và bây giờ chúng ta phải vội vàng.

Nghiên cứu hiện tại đang ở giai đoạn nào cho sự phát triển của vaccin chống lại ASF? Với hướng dẫn nào bạn đang làm việc? Khi nào có thể có vaccin chống lại virus ASF?

Lưu tâm đến những gì đã được mô tả, gần đây đã có những bước tiến lớn trong nghiên cứu vaccin chống lại ASF, và chúng ta đang ở gần hơn bao

giờ hết về việc đưa ra tin tốt. Đối với loại vaccin, chúng tôi có thể nói theo nghĩa rộng:

- **Các vaccin bất hoạt cổ điển** không có khả năng chống lại virus ASF (ASFV), ít nhất là theo cách mà chúng đã được chế tạo cho đến nay, rất có thể là do chúng không có khả năng sản xuất tế bào T gây độc tế bào, yếu tố cần thiết để loại bỏ các tế bào bị nhiễm.

- **Vaccin nhược độc sống** cho dù bằng phương pháp cổ điển hoặc công nghệ, chúng đáp ứng miễn dịch tốt hơn, ít nhất là chống lại virus gây bệnh. Cho đến nay, chiến lược này là chiến lược được coi là gần thị trường hơn và hầu hết các nhóm nghiên cứu về vấn đề này đã đặt hy vọng vào nó, như thể hiện trong một báo cáo của Ủy ban Châu Âu được các chuyên gia dự thảo. Sẽ không dễ dàng, bởi vì các prototypes hiện tại, bao gồm các prototypes được phát triển trong phòng thí nghiệm của USDA ở Plum Island và những prototypes có được thông qua sự hợp tác giữa Trung tâm Sinh học Phân tử Severo Ochoa và CReSA-IRTA sẽ phải được cải thiện trong tương lai trước mắt, về cơ bản từ quan điểm về sự an toàn và khả năng DIVA của chúng (cho phép phân biệt giữa động vật đã được tiêm phòng và bị nhiễm bệnh tự nhiên).

Sự hợp tác bởi USDA-ARS và CReSA-IRTA đảm bảo tối ưu hóa các prototypes. Sự quan tâm đã tăng lên trong lĩnh vực kinh doanh và tài trợ do EU cho phép lạc quan về khả năng có một loại vaccin nhược độc trên thị trường trong vòng 5-10 năm tới, nhưng cũng cần xem xét rằng những thời hạn này được đưa ra bởi một nhà khoa học lạc quan nhưng ít kiến thức về thị trường.

- **Vaccin tiểu phần.** Báo cáo của Ủy ban Châu Âu khuyến khích chúng ta tiếp tục nghiên cứu các loại vaccin tương lai dựa trên các tiểu phần. Sự phức tạp của virus, có hơn 200 loại protein khác nhau và khó khăn trong việc quản lý chúng *in vivo* để chúng được tiếp cận tối ưu với hệ thống miễn dịch, khuyến cáo nên thận trọng hơn trong thời kỳ thương mại hóa. Mặc dù có những lợi thế to lớn về khả năng an toàn và khả năng DIVA, chúng ta phải xem xét hiệu quả bảo hộ thấp cho đến nay chống lại chủng ASFV gây chết lợn. Chúng ta phải tiếp tục làm việc cùng nhau, xác định cả hai loại kháng nguyên bảo vệ virus và các cơ chế miễn dịch chịu trách nhiệm bảo vệ. Tóm lại, cần đầu tư nhiều hơn cho nghiên cứu cơ bản.

Với thông tin có sẵn cho đến nay, mức độ hiệu quả của vaccin sẽ là bao nhiêu?

Luôn luôn khó khăn để ngoại suy kết quả phòng

thí nghiệm ra hiện trường. Điều duy nhất mà chúng ta có thể nói hôm nay là các prototypes vaccin có sẵn trong phòng thí nghiệm của chúng ta bảo vệ 100% lợn chống lại THỦ THÁCH với virus gây bệnh, hiểu được sự bảo vệ là khả năng tránh gây chết (động vật đối chứng chết trong vòng 10 ngày). Sự thật ở một số động vật cho thấy, trong một thời gian ngắn, đã giảm một lượng virus được phát hiện trong máu và dịch tiết mũi khi so sánh với các biện pháp kiểm soát.

Những mục tiêu nào để phải hoàn thành vaccin này?

Một vấn đề quan trọng là mức độ an toàn và khả năng DIVA. Chúng ta không được bỏ qua rằng nó là một loại vaccin sống, vì vậy nó phải được sử dụng với sự đảm bảo an toàn tuyệt đối. Việc sử dụng vaccin dựa trên tiểu phần sẽ dễ dàng hơn và ít hạn chế hơn.

Mặc dù tiêm vaccin có thể sẽ được ngành công nghiệp chăn nuôi chấp nhận, nhưng chúng ta không nên quên một công thức cho việc cho ăn, như mỗi nhừ cho lợn rừng, theo cách tương tự như vaccin phòng bệnh lao hoặc dịch tả lợn cổ điển đang được thử nghiệm.

Đánh giá ảnh hưởng của căn bệnh này trong những năm qua, liệu có đủ nguồn lực toàn cầu dành cho nghiên cứu không?

Có thể ngày nay người ta chú ý nhiều hơn đến vấn đề này và nhiều tiền hơn được phân bổ cho các hành động, nhưng điều này có nghĩa là không có gì nếu nó không được duy trì theo thời gian.

Những lời chỉ trích không chỉ đối với các cơ quan chức năng không coi căn bệnh này đủ nghiêm trọng, mà cả các nhà nghiên cứu, bởi vì đôi khi chúng ta coi những cơ hội này là nơi câu cá để kiếm tiền mà không bao hàm đặt chúng ta đầy đủ trong những khó khăn này. Các nguồn lực bị giới hạn, nói chung, sẽ khiến chúng ta xem xét lại cách sử dụng chúng một cách hợp lý.

Chúng tôi cảm ơn công khai các khoản tiền do Chính phủ Tây Ban Nha đầu tư từ năm 2004 trong nghiên cứu của chúng tôi, tin tưởng vào nó thậm chí trước cả khi virus ASF đe dọa trực tiếp nền kinh tế của chúng tôi một lần nữa. Điều này đã cho phép các công ty như Boehringer Ingelheim (ban đầu) và bây giờ những người khác trở nên quan tâm đến tiến trình của chúng tôi. Chúng tôi cảm thấy rất may mắn ./.

Người dịch: **GS.TS Đặng Ngọc Hào - Hội Thú y Việt Nam.**

CẬP NHẬT TÌNH HÌNH DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI TẠI TRUNG QUỐC

Ngày 15 tháng 2 năm 2019, Rome

Kể từ khi Bộ Nông nghiệp và Nông thôn Trung Quốc (MARA) xác nhận dịch tả lợn châu Phi (ASF) đầu tiên tại tỉnh Liêu Ninh vào ngày 3 tháng 8 năm 2018,

105 ổ dịch ASF đã được phát hiện ở 25 tỉnh/khu tự trị/thành phố. Hơn 950.000 lợn đã bị tiêu hủy trong nỗ lực ngăn chặn sự lây lan.



Bản đồ 1. ASF đến tháng 8/2018

Nguồn: Veterinary Bureau, MARA, Trung Quốc

Các khu vực bị ảnh hưởng:

Trung Quốc: An Huy, Hắc Long Giang, Hà Nam, Cát Lâm, Liêu Ninh, Giang Tô, Chiết Giang, Sơn Tây, Vân Nam, Hồ Nam và Quý Châu, Hồ Bắc, Giang Tây, Phúc Kiến, Tứ Xuyên, Thiểm Tây, Thanh Hải, Quảng Đông và Cam Túc, Thiên Tân, Trùng Khánh, Thượng Hải và Bắc Kinh.

Khu tự trị Nội Mông và Ningxia Hui.

Hành động của Trung Quốc:

Chính phủ thiết lập vùng dịch 3 km và vùng đệm 10 km quanh vùng dịch. Một biện pháp kiểm soát di chuyển nghiêm ngặt đối

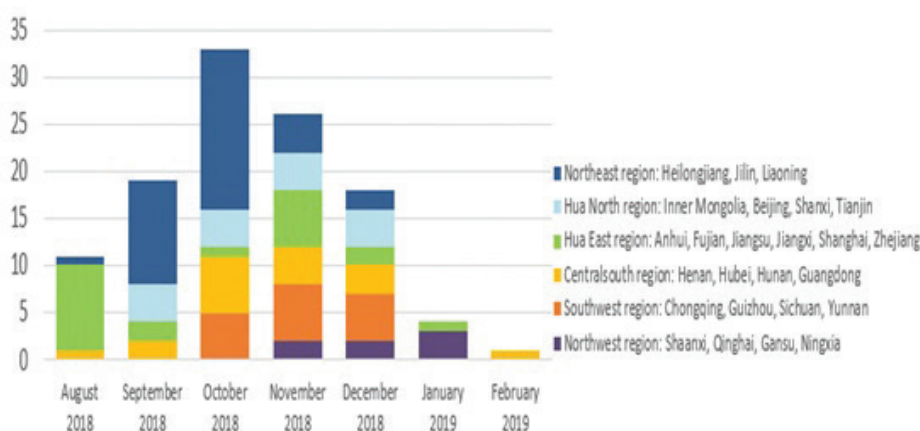
với lợn sống đã được đưa ra và thị trường lợn sống ở các tỉnh bị nhiễm bệnh và các tỉnh lân cận đã bị đóng cửa. Chính phủ yêu cầu tăng cường vận chuyển thịt lợn chứ không phải lợn sống. Các nghiên cứu cho thấy 62% trong số 21 ổ dịch ASF đầu tiên ở Trung Quốc có liên quan đến việc ăn thức ăn thừa. Các chỉ thị về việc cấm cho lợn ăn thức ăn thừa và lưu giữ hồ sơ phương tiện vận chuyển gia súc đã được cập nhật. Các nghiên cứu dịch tễ học của 68 ổ dịch cho thấy 3 nguyên nhân chính gây ra bệnh ASF: 46% do xe cộ và công nhân không được khử trùng, 34% do cho ăn thức ăn thừa và 19% do vận chuyển lợn sống và các sản phẩm của chúng qua các khu vực.

Khi ASF được phát hiện ở lợn rừng, MARA và Bộ Tài nguyên đã đưa ra một thông báo chung về Tăng cường công tác phòng chống và kiểm soát chung đối với ASF ở lợn nhà và lợn rừng hoang. Vào ngày 29 tháng 1 năm 2019, MARA đã ban hành Kế hoạch thực hiện khẩn cấp chống dịch bệnh ASF.

Vào ngày 15 tháng 2 năm 2019, Trung tâm ứng phó thảm họa Đài Loan báo cáo rằng đã phát hiện virus ASF từ một chiếc bánh mì kẹp thịt do một hành khách mang đến sân bay Đài Nam của VietJet từ thành phố Hồ Chí Minh,

Việt Nam vào ngày 5 tháng 2 năm 2019. Trình tự gen cho thấy giống 100% với virus ASF ở Trung Quốc. Nguồn gốc chính xác của thịt là không rõ.

Sau khi đánh giá, khu vực dịch tễ đã được dỡ bỏ tại huyện Zezhou, thành phố Jincheng, tỉnh Sơn Tây vào ngày 13 tháng 2 vì không có trường hợp mới nào được báo cáo ở các khu vực bị ảnh hưởng sau 6 tuần theo dõi và điều tra liên tục. Kể từ ngày 13 tháng 2 năm 2019, khu vực cách ly trong 98 khu vực dịch tễ đã được dỡ bỏ.



Biểu đồ 1. Số lượng làng có ASF trong một tháng ở Trung Quốc (chia theo khu vực)

Nguồn: Veterinary Bureau, MARA, Trung Quốc

Khuyến nghị của FAO với các nước trong khu vực:

- Ngăn chặn dịch bệnh lây lan diện rộng nên được ưu tiên trong các cấp cao nhất của chính phủ.

- Chuẩn bị sẵn sàng (ví dụ: lập kế hoạch dự phòng, quy trình vận hành tiêu chuẩn SOP, hỗ trợ tài chính bảo đảm) để cải thiện cảnh báo sớm, phát hiện và thông báo, phản ứng sớm và phối hợp cần được xem xét và xem xét định kỳ liên quan đến thay đổi tình hình bệnh.

- Áp dụng các biện pháp an toàn sinh học

ng nghiêm ngặt dành riêng cho ngành chăn nuôi lợn, bao gồm thường xuyên vệ sinh và khử trùng trang trại, phương tiện vận chuyển và cải thiện phương thức chăn nuôi và hệ thống sản xuất.

- Tăng cường giám sát việc vận chuyển lợn sống cũng như các sản phẩm thịt lợn.

- Truyền thông và phối hợp tốt giữa ngành sản xuất lợn thương mại và người nuôi lợn là rất cần thiết để tăng cường hợp tác trong phòng ngừa, phát hiện và kiểm soát ASF. Nhận thức và đào tạo của tất cả các bên liên quan, từ bác sĩ thú y đến nông dân, trung gian và các tác nhân

chuỗi giá trị khác là cần thiết.

- Truyền thông tới công chúng để tránh những tin đồn dẫn đến nhận thức về an toàn thực phẩm và gián đoạn tiêu dùng.

- Đăng ký trang trại, nhận dạng động vật và kiểm duyệt là rất cần thiết để cho phép can thiệp sức khỏe động vật.

- Cấm cho ăn thức ăn thừa.

- Tăng cường xử lý chất thải thực phẩm (dịch vụ thực phẩm, sân bay, cảng biển) có thể chứa các sản phẩm thịt lợn chưa nấu chín.

- Các chiến lược kiểm soát bùng phát phải được áp dụng. Các chiến lược cần được phát triển với sự tư vấn của khu vực tư nhân (các nhà sản xuất lợn và các ngành công nghiệp đồng minh như vận chuyển, vận hành thức ăn) để cải thiện các lựa chọn quản lý bệnh và tuân thủ.

- Tăng cường mạng lưới bên trong về chẩn đoán và quản lý bệnh.

- Hiểu chuỗi giá trị lợn và thịt lợn trong nước, với các nước láng giềng là điều cần thiết để cải thiện quản lý rủi ro.

FAO hành động:

- FAO và MARA đã phối hợp tổ chức Hội nghị xuyên biên giới đa phương tại Tiểu vùng sông Mê Kông để tăng cường hợp tác kiểm soát dịch bệnh động vật xuyên biên giới ở Bắc Kinh (Trung Quốc) từ ngày 22-24/11/2018, bao gồm huấn luyện về phòng chống ASF.

- Ngày 16 tháng 11, FAO-Trung Quốc, Trưởng/AGAH và CVO đã gặp Thứ trưởng MARA và nhân viên cấp cao của Cục Thú y và Trung tâm kiểm soát bệnh động vật Trung Quốc. Một lời kêu gọi đoàn kết để giải quyết mối đe dọa toàn cầu của ASF đối với G20 đã được các quan chức Trung Quốc đề xuất.

- Vào ngày 23 tháng 10, Giám đốc thú y của FAO đã gửi một thông điệp tới CVO của Trung Quốc và các nước Đông Nam Á khuyến khích sự chuẩn bị và cảnh giác cao hơn.

- FAO và MARA đã phối hợp tổ chức tư vấn kỹ thuật về "Ứng dụng công nghệ để tăng cường kiểm soát ASF thông qua phát hiện và ứng phó nhanh" vào ngày 11-12/10/2018 tại Bắc Kinh (Trung Quốc) với sự tham gia từ Cục thú y/MARA, Trung tâm kiểm soát dịch bệnh động vật Trung Quốc (CADC), Trung tâm dịch tễ và dịch tễ động vật Trung Quốc (CAHEC).

- FAO đã tổ chức một cuộc tham vấn khu vực khẩn cấp về tình trạng ASF về giảm thiểu rủi ro và chuẩn bị sẵn sàng tại Bangkok, tháng 9 năm 2018.

- Nhiệm vụ của FAO đến Mông Cổ và Trung Quốc (tháng 4 năm 2018) để khám phá các cơ hội trong giám sát lợn rừng.

- FAO xuất bản về ASF lan rộng ở châu Á (tháng 3 năm 2018) và kêu gọi hợp tác khu vực bao gồm các biện pháp phòng bị.

Liên kết hữu ích:

- Phát hiện và chẩn đoán dịch tả lợn châu Phi (ASF). Hướng dẫn sử dụng cho bác sĩ thú y (2017)

- Chiến lược khu vực để kiểm soát ASF ở châu Phi (FAO, AU-IBAR và ILRI, 2017)

- Hướng dẫn chuẩn bị kế hoạch dự phòng dịch tả lợn ở châu Phi (2001)

- Đánh giá rủi ro nhanh khi ASF vào Trung Quốc (tháng 3/2018)

- Thực hành quản lý khẩn cấp tốt: Những điều cần thiết

- Thực hành tốt cho an toàn sinh học trong ngành chăn nuôi lợn (2010)

- Video nhận thức về ASF

- Thẻ bệnh OIE Hướng dẫn OIE (2012) Mã OIE báo cáo tình hình ASF hàng tuần của OIE

- Liên minh nghiên cứu ASF toàn cầu ./.

Người dịch: GS.TS Đặng Ngọc Hào - Hội Thú y Việt Nam.

INTERFERON TYPE I VÀ BỆNH DỊCH TẢ HEO CHÂU PHI

Trần Xuân Hạnh, Nguyễn Quang Huy
Công ty NAVETCO

Dịch tả heo châu Phi (ASF) là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm ở heo nhà và heo rừng do virus thuộc họ *Asfarviridae* gây ra. Các chủng virus ASF (ASFV) cường độc có thể gây tử vong tới 100%, trong khi các chủng có độc lực thấp hơn có thể gây nhiễm trùng không điển hình. Bệnh được phát hiện đầu tiên vào năm 1921 ở các quốc gia nằm phía Nam Sahara (châu Phi), sau đó được phát hiện ở châu Âu (1957), Cuba và Mỹ (1967). Ngày nay, bệnh diễn biến theo 2 hướng: i/ Trở thành dịch lưu cữu đối với những nước đã từng có dịch xảy ra và ii/ Có tính lây lan mạnh, trở thành dịch đại lưu hành (panzootia) nếu bệnh xuất hiện lần đầu tiên.

Virus gây bệnh dịch tả heo châu Phi (ASFV) là một loại virus DNA mạch đôi với chiều dài bộ gen khoảng 170-193 kbp (Chapman và cs, 2008; de Villiers và cs, 2010; Dixon và cs, 2013). Sự thay đổi chiều dài bộ gen do sự chèn và xóa gen trong 5 họ đa gen (Multigenes families - MGF). Chức năng của các gen này trong MGF hiện chưa được biết rõ. Tuy nhiên, một nghiên cứu trước đây cho thấy các gen trong họ MGF360 và MGF505 rất quan trọng trong việc xác định phổ vật chủ (Burrage và cs, 2004) và có liên quan trực tiếp đến việc cảm ứng quá trình sản xuất Interferon (IFN) (Afonso và cs, 2004).

Hiệu quả chống virus của interferon đã được biết từ lâu và là hàng rào bảo vệ đầu tiên chống các bệnh gây ra do virus. IFN type I là một loại cytokine, thành phần quan trọng của hệ thống miễn dịch không đặc hiệu chống lại sự xâm nhiễm virus (Randall và Goodbourn, 2008). Các thành phần của mầm bệnh như acid nucleic được nhận biết bởi các thụ thể nội bào và ngoại bào của vật chủ, từ đó kích hoạt con đường dẫn truyền tín hiệu phức tạp, kích hoạt các tế bào chức năng sản xuất IFN type I. Các cytokine này lần lượt tạo ra sự biểu hiện đặc hiệu của hàng trăm gen khác nhau liên quan đến sự ức chế hoạt động của mRNA, dẫn đến ức chế sự sao chép của virus, từ đó ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của virus, vi khuẩn, ký sinh trùng và các tế bào khối u (Der và cs, 1998).

Virus gây bệnh dịch tả heo châu Phi (ASFV), trong

quá trình sinh sản, chủ yếu sao chép trong bạch cầu đơn nhân và đại thực bào. Có nghiên cứu cho rằng IFN α và IFN β đã được phát hiện trong huyết thanh heo nhiễm ASFV cường độc ở vùng Georgia (Mỹ) năm 2007 (Karalyan và cs, 2012). IFN có thể được các tế bào lân cận tiết ra nhằm đáp ứng với các tín hiệu như cGAMP (2' -5') phát ra từ các tế bào bị nhiễm ASFV (Ablasser và cs, 2013). Ngoài ra, IFN có thể được tiết ra bởi các tế bào tua (Dendritic cells) để đáp ứng với nhiễm ASFV, trong đó tế bào tua plasmacytoid (pDCs) hoặc tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) giàu CD4 +/CD172 + cũng tiết ra một lượng lớn IFN α để đáp ứng với nhiễm virus (Golding và cs, 2016). Kết quả nghiên cứu *in vivo* cho thấy chủng Georgia 2007/1 cường độc kích hoạt lượng lớn các tế bào tua sản xuất IFN nồng độ cao gần 1000 IU/ml, riêng IFN α đạt gần 250 pg/ml trong huyết thanh heo sau 2 ngày nhiễm bệnh. Còn kết quả nghiên cứu *in vitro* cho thấy hiệu giá chủng độc lực thấp OUR T88/3 thiếu gen MGF360 và MGF505 giảm 10 lần trong dịch nuôi cấy đã được bổ sung IFN α tái tổ hợp với nồng độ 2000 IU/ml so với control không được bổ sung IFN. Các kết quả nghiên cứu này khẳng định một điều IFN được cảm ứng biểu hiện một lượng lớn từ các tế bào pDCs và lưu hành trong máu của heo khi có sự xâm nhiễm của chủng virus ASF cường độc, cũng như có thể chống lại sự nhân lên của virus chủng virus ASF độc lực thấp bị khiếm khuyết MGF505-1R và MGF505-2R khi nồng độ IFN đạt khoảng 2000 IU/ml.

Vai trò của IFN ức chế sự nhân lên của virus cũng đã được nghiên cứu ở Việt Nam. Nghiên cứu của nhóm tác giả Trần Xuân Hạnh và cs cho thấy ảnh hưởng của IFN α ức chế quá trình nhân lên của virus PRRS (gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp) phát triển trên tế bào MARC-145. Kết quả chỉ ra rằng tế bào được xử lý IFN α với nồng độ 1250 UI - 2500 UI/ml đã hạn chế sự phát triển của virus PRRS và ở nồng độ 5000 UI/ml gây ức chế hoàn toàn virus nhân lên. Khả năng ức chế virus PRRS nhân lên của IFN α cũng được ghi nhận ở hiệu giá virus chuẩn độ được sau gây nhiễm, với sự khác nhau có ý nghĩa giữa các lô thí nghiệm và đối chứng, $10^{3.0}$ - $10^{4.5}$ TCID $_{50}$ /ml, $10^{2.5}$ - $10^{4.0}$ TCID $_{50}$ /ml và nhỏ hơn $10^{1.0}$ TCID $_{50}$ /ml, tương ứng với các nồng

độ IFN α sử dụng 1250 - 2500 UI và 5000 UI/ml so sánh với $10^{5.5}$ - $10^{6.0}$ TCID $_{50}$ /ml của lô đối chứng. Thí nghiệm cũng chỉ ra có sự khác nhau về hiệu quả ức chế của IFN α khi xử lý tế bào ở các thời điểm khác nhau: Trước nhiễm virus, đồng thời với nhiễm virus và sau khi nhiễm virus. Tiêm vaccin PRRS vô hoạt kết hợp với IFN α đã kích thích đáp ứng kháng thể ở heo và kháng thể chống virus PRRS có thể đo được bằng kỹ thuật ELISA ở ngày thứ 21 sau tiêm vaccin, trong khi lô thí nghiệm chỉ tiêm vaccin hoặc chỉ tiêm IFN α và lô đối chứng cho kết quả ELISA âm tính. Nhiều nghiên cứu cũng đã chứng minh về khả năng của IFN ức chế sự nhân lên của virus DNA. Paez.E và cs thông báo rằng IFN α và IFN γ đã ức chế virus ASF nhân lên trong tế bào Vero và một phát hiện có ý nghĩa khác là việc xử lý liên tục bằng IFN α đã bảo vệ được tế bào Vero không bị phá hủy và tránh được sự nhiễm trùng lâu dài với virus ASF.

Theo thông báo của Cục Thú y (Bộ NN&PTNT) đến ngày 3/3/2019 cho biết, dịch tả heo châu Phi đã xuất hiện ở 202 hộ chăn nuôi thuộc 7 tỉnh, thành phố gồm: Hưng Yên, Thái Bình, Hà Nội, Hải Phòng, Thanh Hóa, Hà Nam, Hải Dương và có nguy cơ lây lan rộng, đe dọa nghiêm trọng đến nghề chăn nuôi heo ở nước ta. Là một bệnh nguy hiểm, gây thiệt hại lớn, nhưng cho đến nay vẫn chưa có vaccin phòng bệnh, điều này đã khiến cho công tác phòng chống bệnh hoàn toàn bị động, tỷ lệ heo chết khi nhiễm virus ASF gần như 100%. Do vậy biện pháp phòng chống bệnh chủ yếu là: Chẩn đoán nhanh, chính xác, tiêu hủy gọn, thực hiện tốt công tác vệ sinh, tiêu độc khử trùng, kết hợp với công tác kiểm dịch chặt chẽ. Đối với những trại heo đã bị nhiễm, biện pháp xử lý là tiêu hủy toàn bộ số heo nhiễm, vệ sinh, tiêu độc và khử trùng chuồng trại triệt để với các thuốc sát trùng như Benkocid, Virkon, Chlorine...v.v. Với các trại chưa bị nhiễm bệnh, song song với việc tăng cường công tác kiểm dịch ra vào trại, cách ly triệt để, vệ sinh khử trùng định kỳ thì việc áp dụng các biện pháp kỹ thuật hiện có nhằm nâng cao sức đề kháng của heo cũng là một công việc cần quan tâm. Và một trong những biện pháp kỹ thuật có thể áp dụng là sử dụng IFN cho đàn heo khỏe.

Hiện nay, IFN α tái tổ hợp đã được kết hợp sử dụng trong việc phòng, trị một số bệnh cho gia súc như: Viêm đường hô hấp, viêm vú, PRRS, TGEV. Trên cơ sở các thông tin khoa học nêu trên về IFN α có khả năng ức chế quá trình nhân lên của virus ASF, để hỗ trợ thêm vào các biện pháp phòng chống bệnh dịch

tả heo châu Phi, trong khi chưa sản xuất được vaccin phòng bệnh, thì đề xuất sử dụng IFN α tái tổ hợp cho đàn heo khỏe có thể là một giải pháp thực tế cần xem xét, nhằm giúp tăng cường miễn dịch không đặc hiệu cho heo và kích hoạt nhanh chóng con đường ức chế sự nhân lên của ASFV trong những ngày đầu, khi mà IFN nội sinh chưa được sản xuất ở một nồng độ đủ cao để chống lại virus.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Afonso C.L., Piccone M.E., Zaffuto K.M., Neilan J., Kutish G.F., Lu Z., Balinsky C.A., Gibb T.R., Bean T.J., Zsak L., Rock D.L. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response. *J. Virol.* 2004;78:1858–1864.
2. Burrage T.G., Lu Z., Neilan J.G., Rock D.L., Zsak L. African swine fever virus multigene family 360 genes affect virus replication and generalization of infection in *Ornithodoros porcinus* ticks. *J. Virol.* 2004;78:2445–2453.
3. Chapman D.A., Tcherepanov V., Upton C., Dixon L.K. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J. Gen. Virol.* 2008;89:397–408.
4. de Villiers E.P., Gallardo C., Arias M., da Silva M., Upton C., Martin R., Bishop R.P. Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virology.* 2010;400:128–136.
5. Der S.D., Zhou A., Williams B.R., Silverman R.H. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95:15623–15628.
6. Dixon L.K., Chapman D.A., Netherton C.L., Upton C. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res.* 2013;173:3–14.
7. Golding J.P., Goatley L., Goodbourn S., Dixon L.K., Taylor G., Netherton C.L. Sensitivity of African swine fever virus to type I interferon is linked to genes within multigene families 360 and 505. *Virology.* 2016 Jun; 493:154–161.
8. Karalyan Z., Zakaryan H., Sargsyan K., Voskanyan H., Arzumanyan H., Avagyan H., Karalova E. Interferon status and white blood cells during infection with African swine fever virus in vivo. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2012;145:551–555.
9. Paez.E, GarciaF, and Carmen Gil Fernandez. Interferon cures cells lytically and persistently infected with African swine fever virus in vitro. *Archives of Virology.* 1990; 112: 115–127.
10. Randall R.E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 2008;89:1–47.
11. Trần Xuân Hạnh, Bùi Anh Thy, Kim Văn Phúc, Nguyễn Tăng Trường. Ảnh hưởng của Interferon alpha (IFN- α) đối với virut gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp lợn. *Tạp chí KHKT Thú y – tập XIX – số 2 – 2012.*

TỪ NGUYÊN TẮC PHÒNG CHỐNG DỊCH BỆNH TRUYỀN NHIỄM ĐẾN PHƯƠNG PHÁP PHÒNG CHỐNG DỊCH BỆNH DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI VÀ ĐỊNH HƯỚNG CÔNG TÁC PHÒNG CHỐNG DỊCH BỆNH TRONG THỜI GIAN TỚI

Hoàng Khánh Hưng

Trạm Chăn nuôi và Thú y huyện Vĩnh Cửu tỉnh Đồng Nai

I. LÝ THUYẾT VỀ ĐIỀU KIỆN ĐỂ XẢY RA DỊCH VÀ NGUYÊN TẮC PHÒNG CHỐNG DỊCH

1. Điều kiện để xảy ra dịch

Nói đến việc phòng chống dịch bệnh truyền nhiễm là nói đến phòng chống sự truyền lây, vì nếu không xảy ra sự truyền lây thì tên gọi Dịch bệnh truyền nhiễm nguy hiểm chỉ còn một chữ « Bệnh » mà không được gắn theo các từ như « Dịch » và « truyền nhiễm nguy hiểm » nữa, vì nó không thể lây lan thành dịch nên không còn tính nguy hiểm.

Mà muốn phòng chống sự truyền lây thì phải lấy Sơ đồ truyền lây làm kim chỉ nam để hành động.

Sơ đồ truyền lây:

Nguồn bệnh → Sự truyền lây → Vật cảm nhiễm

Theo sơ đồ truyền lây thì điều kiện để xảy ra dịch là: Dịch bệnh chỉ có thể xảy ra khi môi trường chăn nuôi hội tụ cả 3 mắt xích sinh học, đó là: Nguồn bệnh, động vật cảm nhiễm và sự truyền lây (sự lây nhiễm mầm bệnh từ nguồn bệnh sang động vật cảm nhiễm).

Trong chăn nuôi, 3 mắt xích sinh học được hiểu như sau:

a/ Động vật cảm nhiễm

Là động vật sẽ bị nhiễm bệnh khi có tiếp xúc với nguồn bệnh. Việc tiêm đầy đủ vacxin phòng bệnh sẽ làm mất tính cảm nhiễm của động vật với mầm bệnh.

b/ Nguồn bệnh

Là động vật mắc bệnh hoặc sản phẩm của động vật nhiễm bệnh như thịt, trứng, sữa, và các dịch

tiết, chất thải khác của động vật bệnh như : đờm, nhớt, máu, nước tiểu, phân. Nguồn bệnh phát sinh chủ yếu do người chăn nuôi thực hiện việc bán tháo động vật mắc bệnh cho thương lái giết mổ lậu và vứt động vật bệnh ra môi trường bên ngoài như : rừng tràm, sông, suối, bãi rác... Vì:

+ Khi vào tay thương lái, gia súc/gia cầm bệnh sẽ phải đi qua các khâu: vận chuyển, giết mổ, buôn bán như gia súc/gia cầm khỏe. Các khâu này sẽ biến các con gia súc, gia cầm bệnh thành nguồn lây không lồ do việc vận chuyển gia súc/gia cầm bệnh không đúng quy định sẽ làm rơi rớt các chất thải như đờm, nhớt, phân, nước tiểu... các loại chất thải này sẽ là các nguồn lây nhỏ được phân tán rải rác trên đường vận chuyển. Việc giết mổ gia súc/gia cầm bệnh sẽ tạo ra nhiều sản phẩm nhỏ khác như đờm, nhớt, máu, nước tiểu, phân... Các sản phẩm này sẽ là các nguồn bệnh nhỏ và được phát tán ra hệ thống cống, rãnh; từ hệ thống cống, rãnh, nguồn bệnh sẽ phân tán ra môi trường và vào khu vực chăn nuôi khi xuất hiện các phương thức truyền lây (các chất thải len lỏi ra sông, suối, giếng... các nguồn nước này sau đó được người chăn nuôi sử dụng). Việc buôn bán thịt gia súc/gia cầm bệnh sẽ làm nguồn bệnh đi theo từng miếng thịt phân tán ra thị trường và vào các nông hộ/ trang trại khi người chăn nuôi sử dụng nhaim thịt của gia súc/gia cầm bệnh.

+ Khi gia súc/gia cầm chết bị vứt ra môi trường, khi nằm ở sông, suối, rừng tràm thì gia súc/gia cầm chết sẽ là một nguồn bệnh tồn tại lâu dài.

c/ Sự truyền lây

Là sự lây truyền mầm bệnh từ nguồn lây vào động vật cảm nhiễm. Sự truyền lây chỉ xuất hiện khi có các điều kiện khách quan và các điều kiện chủ quan. Điều kiện khách quan là gió, nước, chim đưa mầm bệnh từ chuồng gia súc/gia cầm bệnh và

từ xác gia súc/gia cầm bị vớt ra môi trường...vào chuồng gia súc/gia cầm khỏe. Điều kiện chủ quan là do người chăn nuôi không thực hiện an toàn sinh học nên đưa mầm bệnh từ bên ngoài vào chuồng nuôi.

2. Nguyên tắc phòng chống dịch cơ bản

Dịch bệnh chỉ xảy ra khi môi trường chăn nuôi hội tụ đủ 3 mắt xích sinh học. Như vậy muốn phòng chống dịch bệnh, chỉ cần tiến hành cắt đứt 1, 2 hoặc 3 mắt xích sinh học thì dịch bệnh sẽ không thể xảy ra. Phương pháp nào càng cắt được nhiều mắt xích sinh học thì phương pháp đó càng tối ưu.

II. NGUYÊN TẮC PHÒNG CHỐNG BỆNH DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI VÀ PHƯƠNG PHÁP THỰC HIỆN

1. Nguyên tắc phòng chống bệnh dịch tả lợn châu Phi

Theo nguyên tắc phòng chống dịch cơ bản, do bệnh dịch tả lợn châu Phi không có vacxin phòng bệnh nên mắt xích động vật cảm nhiễm là không thể cắt đứt. Vì vậy nguyên tắc phòng chống bệnh dịch tả lợn châu Phi là tìm cách cắt đứt 2 mắt xích còn lại, đó là mắt xích nguồn bệnh và mắt xích sự truyền lây.

2. Phương pháp thực hiện

a. Cắt đứt mắt xích nguồn bệnh

Mắt xích nguồn bệnh chỉ phát sinh do người chăn nuôi thực hiện việc bán tháo động vật mắc bệnh cho thương lái giết mổ lậu hoặc vớt động vật bệnh ra môi trường bên ngoài, nên để cắt đứt mắt xích nguồn bệnh, cần phải ngăn chặn hành vi bán tháo động vật mắc bệnh cho thương lái giết mổ lậu và vớt động vật bệnh ra môi trường bên ngoài. Ngăn chặn bằng cách nào?

Trên thực tế, nguyên nhân làm cho người chăn nuôi thực hiện việc bán tháo động vật mắc bệnh cho thương lái giết mổ lậu và vớt động vật bệnh ra môi trường bên ngoài là do đa số người chăn nuôi không biết chính sách hỗ trợ tiêu hủy (nếu biết thì chẳng ai vớt) và giá hỗ trợ hiện nay luôn thấp hơn giá thị trường.

Do vậy để người chăn nuôi khai báo dịch, không bán tháo động vật mắc bệnh cho thương lái giết mổ lậu và vớt động vật bệnh ra môi trường bên ngoài thì phải làm sao để toàn bộ người chăn nuôi nắm bắt được chính sách hỗ trợ tiêu hủy khi có gia súc bị mắc bệnh truyền nhiễm, đồng thời xác định lại mức hỗ trợ hợp lý để khi phát hiện hoặc nghi ngờ có lợn mắc bệnh dịch tả lợn châu Phi thì người chăn nuôi sẽ lựa chọn việc thông báo dịch bệnh cho cơ quan quản lý thay vì bán cho thương lái giết mổ lậu hoặc vớt xác lợn chết ra môi trường. Để đạt được yêu cầu trên thì ngay từ bây giờ, các cơ quan quản lý cần thực hiện ngay 2 việc sau:

Thứ nhất: phải xác định mức hỗ trợ sao cho hợp lý.

Mức hỗ trợ hợp lý nhất là bằng giá thị trường. Mà thị trường chỉ tính theo các quy cách giá như: lợn giống/con; lợn nái hậu bị/con; lợn nọc hậu bị/con; lợn thịt/kg. Do vậy chính sách giá hỗ trợ cũng được tính như quy cách tính giá thị trường. Ngoài ra trên thực tế tiêu hủy thì có thêm loại lợn con theo mẹ, do loại lợn này không có mức giá thì cho giá bằng lợn giống để khuyến khích người chăn nuôi khai báo dịch.

Giá thị trường thì được xác định bằng cách lấy giá xuất chuồng của 2 trang trại phía Bắc cộng giá của 2 trang trại khu vực miền Trung, cộng giá của 2 trang trại phía Nam và lấy trung bình của 6 trại. Giá trung bình này có thể sẽ cao hơn giá thị trường của một số địa phương, tuy vậy cũng rất tốt, vì điều này sẽ khuyến khích cao độ người chăn nuôi khai báo dịch bệnh mà không sợ người chăn nuôi bán lợn bệnh cho thương lái. Giá hỗ trợ sẽ được thống nhất trên cả nước. Việc thống nhất giá hỗ trợ trong cả nước sẽ làm cho lợn bệnh không trở thành hàng hóa vì không có cung, cầu. Điều này làm mất đi tình trạng chuyển lợn bệnh từ chỗ có giá hỗ trợ thấp đến chỗ có giá hỗ trợ cao làm lây lan dịch bệnh.

Thứ hai: Để người chăn nuôi nắm bắt được chính sách hỗ trợ tiêu hủy.

Tổ chức thông báo bằng mọi hình thức, miễn sao toàn bộ người chăn nuôi đều nắm bắt rõ chính sách hỗ trợ tiêu hủy.

Mặt khác tổ chức xuống tận từng hộ chăn nuôi đề nghị người chăn nuôi ký cam kết không bán chạy lợn bệnh.

b. Cắt đứt mắt xích sự truyền lây

Do mắt xích truyền lây chỉ xuất hiện khi có các điều kiện khách quan và các điều kiện chủ quan, mà các điều kiện khách quan sẽ bị cắt đứt khi người chăn nuôi không bán gia súc, gia cầm bệnh cho thương lái giết mổ lậu và vứt gia súc, gia cầm bệnh ra môi trường nên khi áp dụng các phương pháp để cắt đứt mắt xích nguồn lây (như phần a) là đã cắt đứt được điều kiện khách quan, nên để cắt đứt mắt xích sự truyền lây thì việc còn lại là tìm cách cắt đứt các điều kiện chủ quan.

Để cắt đứt điều kiện chủ quan thì cần trang bị kiến thức và ý thức thực hiện an toàn sinh học cho người chăn nuôi, đặc biệt là người chăn nuôi nhỏ lẻ. Để người chăn nuôi am hiểu và nghiêm túc thực hiện các biện pháp an toàn sinh học thì cần thực hiện tuyên truyền trên loa, đài phát thanh, truyền hình..., đồng thời tổ chức xuống tận từng hộ phát tài liệu về an toàn sinh học và đề nghị người chăn nuôi ký cam kết thực hiện các biện pháp an toàn sinh học.

Việc tổ chức đến tận các hộ chăn nuôi ký cam kết thực hiện các biện pháp an toàn sinh học và không bán chạy lợn bệnh sẽ có thể nâng cao kiến thức về an toàn sinh học cho người chăn nuôi, đồng thời có thể huy động được toàn bộ người chăn nuôi cùng đồng hành thực hiện công tác phòng chống dịch với chính quyền địa phương. Khi việc chống dịch được toàn bộ người chăn nuôi tham gia thì chắc chắn dịch bệnh sẽ mau chóng bị dập tắt vì không còn chỗ cho các mắt xích tồn tại.

III. ĐỊNH HƯỚNG CHO CÔNG TÁC PHÒNG CHỐNG DỊCH BỆNH TRONG THỜI GIAN TỚI

Theo nền kinh tế mở thì dịch bệnh trên động vật sẽ có xu hướng ngày càng xuất hiện các dịch bệnh mới trong khi chưa có vaccin như là bệnh dịch tả lợn châu Phi. Do vậy việc phòng chống các dịch bệnh này không thể bằng vaccin mà phải bằng công cụ quản lý.

Nếu để ý kỹ, chúng ta sẽ thấy công tác phòng chống dịch chủ yếu phụ thuộc vào người chăn nuôi qua việc áp dụng an toàn sinh học và thông báo dịch bệnh cho cơ quan quản lý, vì nếu hai việc này được làm tốt thì sẽ cắt đứt được 3 mắt xích sinh học trong sự truyền lây dịch bệnh. Nhưng do đặc thù nên hai việc này chỉ có thể do người chăn nuôi thực hiện mà cơ quan quản lý dù có muốn cũng không thể làm thay được.

Do vậy, để đảm bảo người chăn nuôi luôn thực hiện an toàn sinh học và báo dịch thì trong thời gian tới cần thực hiện các việc sau:

- Bổ sung vào Luật Thú y về điều kiện để được chăn nuôi. Theo đó để được chăn nuôi thì người chăn nuôi (kể cả nhỏ lẻ và trang trại) phải được đào tạo về an toàn sinh học và được cấp chứng chỉ. Song song với điều kiện chăn nuôi là ban hành chế tài thật nặng hành vi chăn nuôi mà không có chứng chỉ an toàn sinh học.

- Luôn công bố và duy trì chính sách hỗ trợ tiêu hủy bằng giá thị trường để khuyến khích cao độ người chăn nuôi báo dịch, qua đó cơ quan quản lý có thể kiểm soát được tình hình dịch bệnh và có thể thực hiện nghĩa vụ « phát hiện nhanh, tiêu diệt gọn » để cắt đứt có hiệu quả mắt xích nguồn lây, vì suy cho cùng, không có nguồn lây thì không có sự lây lan, bùng phát dịch bệnh.

Lợi ích khi người chăn nuôi luôn thực hiện an toàn sinh học và báo dịch kịp thời

- Việc người chăn nuôi luôn thực hiện an toàn sinh học và báo dịch kịp thời làm dịch bệnh không thể nổ ra, lúc này việc tiêm vaccin miễn phí là không cần thiết. Mà việc không tiêm vaccin sẽ làm giảm rất nhiều chi phí cho người chăn nuôi và chi phí từ ngân sách cho chính sách tiêm phòng miễn phí, đồng thời đáp ứng được điều kiện xuất khẩu thịt.

- Việc hỗ trợ tiêu hủy được duy trì với giá thống nhất trên toàn quốc sẽ làm cho thịt bẩn không còn là hàng hóa. Lúc đó sẽ không còn trường hợp nào chờ động vật, sản phẩm động vật mắc bệnh đi tiêu thụ ở cả nước, không còn việc gia súc, gia cầm bệnh đi vào chợ, vào bữa cơm cho sinh viên, cho công nhân nữa./.



COGLAPEST® & Dịch vụ kỹ thuật đánh giá miễn dịch bảo hộ Dịch tả heo cổ điển (CSF)

Tác giả: BSTY Nguyễn Văn Non – Giám đốc Kỹ thuật heo, Ceva Việt Nam

Dịch tả heo cổ điển (CSF: Classical Swine Fever) là một trong những bệnh rất thường gặp, xảy ra trên mọi lứa tuổi của heo gây chết nhanh và tỷ lệ chết cao. Cần phân biệt rõ CSF với dịch tả heo châu Phi (ASF: African Swine Fever), nhất là trong tình hình dịch tễ phức tạp hiện nay.

Về triệu chứng và bệnh tích, giữa ASF và CSF gần như không có khác biệt. Theo các chuyên gia đầu ngành, bệnh ASF có thể có tiêu chảy ra máu, trong khi bệnh CSF không có dấu hiệu này. Mặc dù vậy, không nên chỉ dựa vào triệu chứng lâm sàng để **chẩn** đoán phân biệt ASF và CSF, mà nên kết hợp với xét nghiệm huyết thanh (kháng thể) và virus (RT-PCR/PCR) nhằm xác định rõ ràng mầm bệnh để có phương pháp phòng bệnh phù hợp.



Một yếu tố quan trọng cần lưu ý: ASF chưa có vắc-xin phòng bệnh và chưa hiểu rõ cơ chế miễn dịch bảo hộ; trong khi đó, nhiều nghiên cứu chứng minh CSF có miễn dịch bảo hộ chắc chắn khi heo được tiêm vắc-xin đầy đủ.

Sau khi tiêm vắc-xin CSF, rất nhanh có được miễn dịch bảo hộ, trong vòng 7 ngày sau tiêm có thể bảo hộ 100%. Điều quan trọng cho trại là cần có chương trình tiêm phòng phù hợp, được kiểm tra đánh giá miễn dịch định kỳ và sử dụng loại vắc-xin đảm bảo an toàn và hiệu quả.

COGLAPEST® - AN TOÀN & HIỆU QUẢ

COGLAPEST® là vắc-xin phòng bệnh CSF, rất an toàn và được hỗ trợ bằng chương trình kiểm tra kháng thể trung hòa (Sero-Neutralization test, hay SN TEST) giúp đánh giá chính xác mức độ bảo hộ của đàn heo và đưa ra chương trình tiêm phòng phù hợp cho trại.

Đây là vắc-xin sống nhược độc, sản xuất từ dòng virus Thiverval, được chọn lọc và nhân đơn dòng 170 lần trong tế bào thận heo, rồi nuôi cấy ở nhiệt độ thấp (29° - 30°C). Điều này rất quan trọng nhằm đảm bảo tính **an toàn tuyệt đối cho tất cả các nhóm heo tiêm phòng**.

Thiverval là dòng lạnh và ổn định, virus trong vắc-xin có tính ổn định di truyền cao, không có khả năng sống sót ngoài môi trường, không lây truyền ngang (nhờ hạn chế bởi thân nhiệt cơ thể) và không gây phản ứng sau tiêm (do tương thích tế bào thận heo). An toàn cho cả nái mang thai và heo con sơ sinh.



COGLAPEST® giúp bảo hộ nhanh chóng trong vòng 7 ngày sau tiêm phòng.

Một thí nghiệm được tiến hành ở Thái Lan, dưới sự giám sát của Trung tâm an toàn sinh học của **Chính phủ** (Pakchong) cho thấy: **khả năng bảo hộ sau khi công cường độc 7 ngày là 100%**.

Tuổi tiêm phòng	Khả năng bảo hộ (%)	
	Công độc sau tiêm 3 ngày	Công độc sau tiêm 7 ngày
4 tuần tuổi	50%	100%
12 tuần tuổi	50%	100%

COGLAPEST® - CHƯƠNG TRÌNH TIÊM PHÒNG

Chương trình tiêm phòng phù hợp cho **COGLAPEST®** cần dựa vào 3 yếu tố không thể tách rời như sau:

- ✓ Tạo miễn dịch ổn định cho đàn giống (nái, nọc...),
- ✓ Tối ưu hoá kháng thể mẹ truyền & định lượng kháng thể trung hoà trước khi tiêm phòng cho heo con,
- ✓ Tiêm phòng 2 mũi cho heo.

Khuyến cáo tiêm phòng cho heo nọc 2 lần/năm. Đối với nái tiêm trước đẻ 5 tuần nhằm tối ưu kháng thể mẹ truyền và kết hợp với quản lý tốt heo con bú sữa đầu. Ở đàn con, phải đánh giá mức độ kháng thể trung hoà (kháng thể thụ động) trước khi tiêm phòng, điều này rất quan trọng, nhằm tránh trung hoà miễn dịch vắc-xin và đảm bảo khả năng bảo hộ tốt ở heo con.

Dịch vụ hỗ trợ **SN TEST** đã kiểm tra gần 20 ngàn mẫu huyết thanh từ năm 2011 đến nay, và công cụ **SN TEST** này được xem là giải pháp hữu hiệu đi kèm với vắc-xin **COGLAPEST®** giúp người chăn nuôi yên tâm về chương trình phòng bệnh Dịch tả heo cổ điển (CSF) hiệu quả.



SN TEST – XÁC ĐỊNH KHÁNG THỂ TRUNG HOÀ CHỐNG LẠI VIRUS GÂY BỆNH CSF

Đầu tiên cần xác định đâu là ngưỡng bảo hộ đối với kháng thể trung hoà?

Một thí nghiệm công độc sau khi tiêm **COGLAPEST®** được tiến hành, kết quả cho thấy: (*Launais & các cộng sự*)

“Ngưỡng kháng thể trung hoà chủ động sau khi tiêm phòng với COGLAPEST® từ 1:4 (tương đương 2log₂) là đủ bảo hộ sau khi công độc”.

Số heo	Hiệu giá kháng thể trung hòa SN lúc công độc	Khả năng bảo hộ
13	< 1:2	25%
12	< 1:2	17%
8	< 1:2	0
7	< 1:2	75%
10	< 1:4	100%
11	= 1:4	100%
9	> 1:4	100%
8	> 1:4	100%
12	> 1:4	100%
8	= 1:8	100%
12	= 1:8	100%
7	> 1:8	100%
7	> 1:16	100%
6	> 1:32	100%

Nghiên cứu cũng tiến hành trên heo con theo mẹ có hàm lượng kháng thể mẹ truyền khác nhau ở các nhóm tuổi khác nhau. Kết quả cho thấy, **mức hiệu giá kháng thể trung hoà từ 1:8 (giá trị tương đương 3log₂) là đủ bảo hộ heo con sau khi công độc.**

Ngày tuổi	Hiệu giá kháng thể trung hòa SN lúc công độc	Khả năng bảo hộ
34	> 1:16	100%
42	1:8 < SN < 1:16	100%
57	< 1:4	75%

Tiếp theo cần xác định thời điểm tiêm phòng phù hợp cho heo con. Thời điểm tiêm phòng phải thỏa mãn 2 điều kiện:

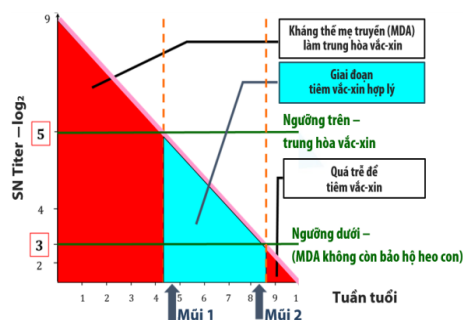
- ✓ Heo con vẫn còn kháng thể mẹ truyền bảo hộ.
- ✓ Kháng thể thụ động không cản trở đáp ứng miễn dịch sau khi tiêm phòng trên heo con.

COGLAPEST® - THỜI ĐIỂM TIÊM PHÒNG PHÙ HỢP

Theo Pachariyanon & các cộng sự (J.Thai.Vet.Med):

Hàm lượng kháng thể mẹ truyền SN ≥ 32 (tương đương 5log₂) tại thời điểm tiêm phòng sẽ ảnh hưởng đến khả năng đáp ứng miễn dịch.

Vì vậy, nên chọn thời điểm tiêm phòng cho heo con khi kháng thể mẹ truyền nhỏ hơn 5log₂ (không làm trung hoà vắc-xin) và $\geq 3\log_2$ (vẫn còn bảo hộ).



SN TEST – CHƯƠNG TRÌNH LẤY MẪU HUYẾT THANH & ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ TIÊM PHÒNG

Chương trình SN TEST trên đàn heo được khuyến cáo:

1. Heo nọc và hậu bị (đực/cái)
2. Heo nái theo lứa đẻ (lứa 1-2-3, lứa 4-5-6, nái >6 lứa)
3. Heo con theo mẹ ở các nhóm tuần tuổi: 1, 3, 5 tuần,
4. Heo sau khi tiêm phòng: 8, 12, 16, 20 tuần tuổi.

Lưu ý: Mỗi nhóm heo lấy ít nhất 5-10 mẫu.

Phân tích kết quả dựa trên 2 thông số:

- ✓ GMT: giá trị trung bình (tùy thuộc vào nhóm heo),
- ✓ CV(%): độ biến thiên (tốt nhất nếu CV<30%).

Kết quả được đội ngũ kỹ thuật của Ceva Vietnam phân tích và đưa ra khuyến cáo.

KẾT LUẬN

Kiểm soát bệnh CSF có tính chất quan trọng trong tình hình hiện nay. Sử dụng vắc-xin phải có tính an toàn cao và đảm bảo đánh giá được khả năng bảo hộ sau tiêm phòng, là hai việc rất quan trọng và không thể tách rời.

Bên cạnh đó, cần tập trung nâng cao sức đề kháng của đàn, tiêm phòng các bệnh quan trọng khác (đặc biệt là PRRS, PCV2...) nhằm tối ưu đáp ứng miễn dịch. Quản lý heo con bú sữa đầu tốt và kiểm tra kháng thể trước khi tiêm để quyết định thời điểm tiêm phòng hợp lý.

HƯỚNG DẪN TRÌNH BÀY MỘT BÀI BÁO KHOA HỌC, GỬI BÀI VÀ LỆ PHÍ

I. TRÌNH BÀY BÀI BÁO KHOA HỌC (Khổ: A4, cỡ chữ: 12, font chữ: Time New Roman. Tổng số trang của bài báo không vượt quá 10 trang).

1. Tên bài tiếng Việt và tiếng Anh (Title)

- Tên bài nói lên nội dung chính của nghiên cứu, vấn đề muốn giải quyết (khoảng 20 từ).
- Sau tên bài là tên tác giả, đơn vị công tác, email và địa chỉ nhận Tạp chí biểu (trường hợp nhiều tác giả thì ghi tác giả chính trước, sau đó là các đồng tác giả (không quá 6 tên tác giả, nếu quá số đó ghi thêm là "cs"). Đánh dấu số thứ tự bên cạnh tên tác giả để ghi chú đơn vị công tác).

2. Tóm tắt (Summary)

Nêu ngắn gọn (khoảng 150 - 250 từ), tóm tắt nội dung chính của bài báo, thể hiện bao gồm mục đích, phương pháp và kết quả chính của bài báo. Tóm tắt có 2 phần: bằng tiếng Việt và tiếng Anh, dưới có ghi từ khóa (keywords) là những từ quan trọng nói lên được nội dung chính của nghiên cứu và đặc trưng chủ đề của bài báo. Từ khóa không quá dài, khoảng 5 - 7 từ.

3. Mở đầu hoặc Đặt vấn đề (Introduction)

Lý do thực hiện nghiên cứu: xuất phát từ tình hình thực tế, vấn đề đang xảy ra, vấn đề đang tồn tại, vấn đề đã và đang được quan tâm, yêu cầu cần thiết phải được làm rõ, yêu cầu từ thực tiễn sản xuất, thông tin từ các nước khác qua tài liệu, những kiến thức nào đã có trước, những tác giả đã và đang làm về vấn đề này vv...

4. Nội dung, nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu (Contents, Materials and Methods)

4.1. Nội dung nghiên cứu

- Có bao nhiêu nội dung cần nghiên cứu (1, 2, 3, 4 vv...), có tiêu đề của từng nội dung phục vụ cho chủ đề nghiên cứu, phải sắp xếp nội dung nghiên cứu theo logic để dẫn đến kết quả mong muốn của đề tài nghiên cứu.
- Trong nội dung chính có thể có thêm những nội dung phụ.

4.2. Nguyên liệu

- Đối tượng, địa điểm, thời gian và phạm vi nghiên cứu.
- Các nguyên vật liệu, trang thiết bị, phòng thí nghiệm, môi trường, hóa chất, động vật thí nghiệm được sử dụng trong nghiên cứu.

4.3. Phương pháp nghiên cứu

Nếu sử dụng các phương pháp chuẩn đã được ban hành, cần ghi rõ ký hiệu phương pháp, ví dụ theo TCVN, ISO hoặc AOAC.... Trong trường hợp tự xây dựng thí nghiệm cần phải mô tả chi tiết, thiết lập bảng biểu và các chỉ tiêu theo dõi, đánh giá vv...

5. Kết quả và thảo luận (Results and Discussion)

- Mục này trình bày những kết quả nghiên cứu và thảo luận kết quả nghiên cứu theo từng nội dung. Dữ liệu được trình bày theo bảng biểu, đồ thị hình vẽ, hình ảnh v.v... nên tập trung phân tích những điểm có thể chưa rõ, những sự giống hoặc khác biệt với kết quả của các tác giả khác trong và ngoài nước hoặc kết quả không như kỳ vọng. Có thể phân tích những lý do nào đã dẫn đến những kết quả đạt được như kỳ vọng hoặc ngược lại vv...
- Diễn giải phân tích kết quả, những ưu điểm và hạn chế, tách bạch rõ ràng dữ liệu và suy luận.

- Mỗi liên hệ giữa kết quả nghiên cứu của tác giả với những phát hiện khác trong các nghiên cứu trước đó. Chứng minh sự đóng góp của tác giả bổ sung cho lý thuyết và kiến thức, hay điều chỉnh những sai sót của các đề tài nghiên cứu trước đó, hoặc là kết quả đóng góp cho thực tiễn giải quyết được vấn đề đặt ra, hoặc là đưa vào sản xuất diện hẹp, hoặc là chuyển giao công nghệ cho nhà sản xuất vv...

6. Kết luận (Conclusion)

- Kết luận cần rút ra được gì qua kết quả nghiên cứu và biểu thị bằng số liệu định lượng.
- Kết luận chỉ thể hiện kết quả nghiên cứu của tác giả theo nội dung nghiên cứu.
- Kết luận không viết theo kiểu giải thích, hoặc lập lại như phần giới thiệu.
- Kết luận cần ngắn gọn, rõ ràng.

7. Tài liệu tham khảo (Reference)

- Cần viết một số tài liệu tham khảo chính trong và ngoài nước về cùng chủ đề (không quá 10 tài liệu). Ghi rõ tên tác giả, năm xuất bản, tên tài liệu, nguồn tài liệu (tập, số, trang).

II. GỬI BÀI

- Bản thảo là bản điện tử (file mềm) gửi về tòa soạn theo địa chỉ Email: **tckhktthuy@gmail.com**
- Sau khi xuất bản, tác giả chính trong bài sẽ nhận được 1 quyền miễn phí, gửi về tận nơi theo đường bưu điện.

III. LỆ PHÍ

Lệ phí phản biện, đăng bài: **500.000 đ/bài** gửi bằng tiền mặt hoặc chuyển khoản theo địa chỉ:
 Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y: Số 86, Trường Chinh, Phương Mai, Đống Đa, Hà Nội.
 Số tài khoản: **1300 201 220 282**. Ngân hàng Nông nghiệp và PTNT – Chi nhánh Thăng Long ./.

MẪU PHIẾU ĐẶT MUA TẠP CHÍ KHKT THÚ Y NĂM 2019

Tên người/đơn vị đặt mua:.....Số ĐT:.....

Địa chỉ (ghi cụ thể để gửi Tạp chí):.....

Đặt mua: Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y năm 2019 (1 năm 8 số)

Số lượng mỗi số:.....quyển x 8 số =quyển

Giá đơn vị: 35.000đ/quyển

Thành tiền: 35.000đ xquyển =đ

(Ghi bằng chữ:.....)

Tiền đặt mua xin gửi tiền mặt qua bưu điện hoặc chuyển khoản về:

Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y

86, Trường Chinh, Phương Mai, Đống Đa, Hà Nội

Tài khoản: **1.300 201 220 282**

Ngân hàng Nông nghiệp và PTNT – Chi nhánh Thăng Long

Ngày / /2019

Người đặt mua
(ký và ghi rõ họ tên)

Ghi chú: - Phiếu đặt mua có thể gửi theo bưu điện hoặc qua Email: **tckhktthuy@gmail.com**

- Tòa soạn sẽ gửi tới độc giả đúng số lượng vào địa chỉ như đã đăng ký ở trên theo đường bưu điện.