

KẾT QUẢ PHÂN LẬP, XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VI KHUẨN *CL. PERFRINGENS* Ở LỢN CON TIÊU CHẢY TẠI CÁC TỈNH PHÍA BẮC

Trần Đức Hạnh¹ Nguyễn Quang Tuyên², , Cù Hữu Phú³

TÓM TẮT

Nuôi cấy, phân lập vi khuẩn *Cl. perfringens* từ các mẫu bệnh phẩm của lợn con tiêu chảy tại một số tỉnh miền Bắc cho thấy:

- Tỷ lệ phân lập vi khuẩn *Cl. perfringens* ở các mẫu phân lợn tiêu chảy là 59,82% và ở lợn con bình thường là 26,78%. Các chủng *Cl. perfringens* phân lập được từ bệnh phẩm có tỷ lệ cao nhất ở ruột già (66,67%), sau đó ở ruột non (61,90%) và thấp nhất là ở lách (14,28%)

- Các chủng *Cl. perfringens* phân lập được đều mang đầy đủ các đặc tính sinh học điển hình và có độc lực cao, gây chết 100% số chuột thí nghiệm từ 18-48 giờ sau tiêm với bệnh tích bụng chướng to, phổi viêm, xuất huyết bề mặt gan, lách sưng to, ruột xuất huyết, tim nhão. Lấy máu tim cấy vào môi trường yếm khí thì đều phân lập lại được vi khuẩn *Cl. perfringens*.

- Các chủng *Cl. perfringens* phân lập được mẫn cảm cao với Penicillin G (95,00%), tiếp sau là Lincomycin (91,67%); kháng lại một số kháng sinh như Gentamicin (93,33%), Enrofloxacin (91,67%), Tetracyclin (90,00%) và Kanamycin (69,33%).

Từ khóa: Lợn con, Tiêu chảy, Vi khuẩn *Cl. perfringen*, Độc lực, Kháng sinh.

RESULTS OF ISOLATION, DETERMINATION OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACTERIA *CL. PERFRINGENS* ON PIGLETS WITH DIARRHEA IN NORTHERN PROVINCES

Nguyễn Quang Tuyên, Trần Đức Hạnh, Cù Hữu Phú

SUMMARY

Culture, isolation of bacteria *Cl. perfringens* from samples of piglets with diarrhea in some northern provinces showed that:

- The rates of *Cl. perfringens* isolated in feces samples of diarrheic pig was 59.82% and in normal pigs was 26.78%. Strains of *Cl. perfringens* isolated from viscera samples had the highest rates in the large intestine (66.67%), then in the small intestine (61.90%) and lowest in spleen (14.28%)

- The strains of *Cl. perfringens* isolated had carried a full biological characteristics and were highly virulent, killed 100% of experimental mice from 18-48 hours after injection with lesions as abdominal distention, lung inflammation, bleeding surface liver, swollen spleen, haemorrhagic intestine, flabby heart. Using heart blood to culture on environment anaerobic, had been isolated *Cl. perfringens* bacteria.

- The strains of *Cl. perfringens* isolated were highly susceptible to Penicillin G (95.00%), followed by Lincomycin (91.67%). They were resistant to some antibiotics such as Gentamicin (93.33%), Enrofloxacin (91.67%), Tetracycline (90.00%) and Kanamycin (69.33%).

Key words: Piglets, Diarrhea, *Cl. perfringens*, Virulence, Antibiotic

1. Công ty TTY Marphavet

2. Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

3. Viện thú y

I. ĐẶT VẤN ĐỀ:

Trong chăn nuôi lợn sinh sản, ngoài các bệnh truyền nhiễm thường xảy ra thì hội chứng tiêu chảy cũng thường gặp ở lợn con theo mẹ. Hội chứng tiêu chảy ở lợn con do nhiều nguyên nhân gây ra, có nguyên nhân là nguyên phát hoặc thứ phát kết hợp với điều kiện bất lợi của điều kiện ngoại cảnh. Trong đường tiêu hoá của động vật, ngoài các vi khuẩn có lợi tác dụng lên men, phân giải các chất trong đường tiêu hoá, giúp cho sinh lý tiêu hoá của gia súc diễn ra bình thường thì bên cạnh đó một số vi khuẩn như *E.coli*, *Salmonella spp*, *Shigella*, *Klebsiella* hay *Cl. perfringens*...là những vi khuẩn quan trọng gây rối loạn tiêu hoá, viêm ruột, tiêu chảy ở người và nhiều loài động vật khi có điều kiện thuận lợi (Vũ Văn Ngũ, 1979). Theo Phạm Thế Sơn và cs. (2008) ở lợn con tiêu chảy, loạn khuẩn chủ yếu liên quan tới tăng số lượng đột ngột của ba loại vi khuẩn là *E. coli*, *Salmonella spp* và *Cl. perfringens*...Do vậy, để phân biệt rõ nguyên nhân gây tiêu chảy ở gia súc không phải là việc giản đơn. Tuy nhiên, lợn con ở giai đoạn đầu sau khi sinh đến dưới hai tháng tuổi bị tiêu chảy có biểu hiện phân thối lẫn chảy keo nhầy, tỷ lệ chết cao chủ yếu là do viêm ruột hoại tử (VRHT), nguyên nhân chính là do vi khuẩn *Clostridium perfringens* gây ra. Để có cơ sở đánh giá tình hình lợn con mắc bệnh viêm ruột hoại tử do *Cl. perfringens* và vai trò gây bệnh của chúng và đề xuất biện pháp phòng trị có hiệu quả cao, chúng tôi đã triển khai nghiên cứu xác định vi khuẩn *Cl. perfringens* trong hội chứng tiêu chảy ở lợn con.

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

2.1. Nội dung:

- Phân lập, xác định tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Cl. perfringens* từ các mẫu bệnh phẩm và phân lợn mắc tiêu chảy.
 - Xác định một số đặc tính sinh học, khả năng kháng kháng sinh của các chủng *Cl. perfringens* phân lập được.

2.2. Nguyên vật liệu

- Mẫu bệnh phẩm: máu tim, gan, lách, dịch ruột... và phân của lợn con dưới hai tháng tuổi mắc tiêu chảy nuôi tại các tỉnh Thái Nguyên, Bắc Giang và Vĩnh Phúc.
- Các loại môi trường dùng cho nuôi cấy, phân lập và kiểm tra một số đặc tính sinh học của vi khuẩn yếm khí.
- Chuột nhắt trắng khỏe mạnh (18 – 20g/con)
- Các loại giấy thấm kháng sinh của hãng Oxoid (Anh).
 - Hoá chất, dụng cụ, máy móc... phòng thí nghiệm nghiên cứu vi sinh vật.

2.3. Phương pháp nghiên cứu:

- Các phương pháp nuôi cấy và giám định vi khuẩn *Cl. perfringens* được tiến hành theo quy trình của Bộ môn Vi trùng, Viện Thú y.
- Xác định độc lực của các chủng vi khuẩn *Cl. perfringens* phân lập được bằng phương pháp tiêm truyền qua động vật thí nghiệm.
- Xác định tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn *Cl. perfringens* phân lập được theo phương pháp khuếch tán trên thạch.
- Kết quả được xử lý bằng phương pháp toán học thông dụng và Excel 2003.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN:

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Cl. perfringens* từ các mẫu bệnh phẩm của lợn mắc tiêu chảy

Để đánh giá nguyên nhân gây tiêu chảy ở lợn con, ngoài một số loài vi khuẩn như *E. coli*, *Salmonella spp* còn có do vi khuẩn *Cl. perfringens* hay không, chúng tôi đã tiến hành phân lập vi khuẩn *Cl. perfringens* từ các mẫu bệnh phẩm của lợn mắc tiêu chảy. Kết quả phân lập được trình bày ở bảng 1 và 2.

Bảng 1: Kết quả phân lập vi khuẩn *Cl. perfringens* ở phân lợn con

Địa điểm (tỉnh)	Lợn tiêu chảy			Lợn bình thường		
	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu (+)	Tỷ lệ (%)	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu (+)	Tỷ lệ (%)
Thái Nguyên	80	47	58,75	19	5	26,63
Bắc Giang	74	44	58,01	20	6	30,00
Vĩnh Phúc	70	43	61,42	17	4	23,52
Tính chung	224	134	59,82	56	15	26,78

Kết quả ở bảng 1 cho thấy với 224 mẫu phân lợn con mắc tiêu chảy thu thập tại Thái Nguyên, Bắc Giang và Vĩnh Phúc có 134/224 mẫu phân lập được vi khuẩn *Cl. perfringens*, chiếm tỷ lệ 59,82%, trong đó cao nhất là ở tỉnh Vĩnh Phúc (61,42%), tiếp sau là ở Thái Nguyên (58,75%) và thấp nhất là ở Bắc Giang (58,01%). Ở lợn con bình thường, tỷ lệ phân lập được vi khuẩn *Cl. perfringens* trong mẫu phân chỉ chiếm 26,78%. So sánh tỷ lệ phân lập vi khuẩn *Cl. perfringens* ở lợn con tiêu chảy với lợn con bình thường thấy tăng 223,37%. Qua đó cho thấy, khi lợn con mắc tiêu chảy ngoài nguyên nhân do một số loài vi khuẩn thường gặp như *E. coli*, *Salmonella spp.* thì vi khuẩn *Cl. perfringens* cũng là một trong những căn nguyên nguy hiểm gây hậu quả nghiêm trọng cho chăn nuôi lợn ở các trang trại và gia trại.

Bảng 2: Kết quả phân lập vi khuẩn *Cl. perfringens* ở bệnh phẩm lợn con mắc tiêu chảy

Bệnh phẩm	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu (+)	Tỷ lệ (%)
Máu tim	21	-	-
Gan	21	8	38,09
Lách	21	3	14,28
Thận	21	-	-
Hạch màng treo ruột	21	4	19,04
Ruột non	21	13	61,90
Ruột già	21	14	66,67

Qua kết quả ở bảng 2 cho thấy vi khuẩn *Cl. perfringens* đều phân lập được ở gan, lách và ruột. Tỷ lệ *Cl. perfringens* phân lập được ở ruột già chiếm tỷ lệ cao nhất (66,67%), sau đó ở ruột non (61,90%), tiếp đến ở gan (38,09%), hạch màng treo ruột (19,04%) và thấp nhất là ở lách (14,28%). Như vậy, sự có mặt của vi khuẩn yếm khí *Cl. perfringens* trong mẫu bệnh phẩm đã chứng tỏ được vai trò quan trọng của chúng là nguyên nhân gây tiêu chảy và viêm ruột hoại tử ở lợn từ sơ sinh đến 60 ngày tuổi.

Một số tác giả như Nguyễn Ngọc Nhiên và cs (1996) khi nghiên cứu viêm ruột hoại tử ở heo, nai do *Cl. perfringens* hoặc Phan Thanh Phụng và cs (1996) nghiên cứu xác định vai trò của vi khuẩn yếm khí *Clostridium perfringens* trong hội chứng tiêu chảy ở lợn cũng đã khẳng định vi khuẩn *Cl. perfringens* là nguyên nhân đặc biệt nguy hiểm, gây bệnh viêm ruột hoại tử cho heo, nai con, lợn con giai đoạn theo mẹ và xảy ra trầm trọng đối với gia súc từ 3-4 ngày tuổi cho đến dưới một tuần tuổi.

3.2. Kết quả giám định một số đặc tính sinh vật, hóa học của các chủng vi khuẩn *Cl. perfringens* phân lập được

Bảng 3: Kết quả kiểm tra đặc điểm hình thái, tính chất nuôi cấy và một số đặc tính sinh vật hóa học của các chủng vi khuẩn *Cl. perfringens*

TT	Đặc điểm	Số chủng kiểm tra	Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)
1	Hình thái (trực khuẩn)	60	60	100
2	Gram (+)	60	60	100
3	Di động	60	0	0
4	Dung huyết	60	60	100
5	Sinh H ₂ S	60	49	81,67
6	Sinh Indol	60	0	0
7	P/ứ CAMP ngược	60	60	100
8	Egg Yolk Agar	60	60	100
9	Glucose	60	60	100
10	Lactose	60	60	100
11	Arabinose	60	0	0
12	Xylose	60	0	0

Kết quả bảng 3 cho thấy 100% các chủng *Cl. perfringens* phân lập được đều là trực khuẩn, bắt màu Gram dương. Các chủng *Cl. perfringens* được kiểm tra đều tạo dung huyết khi nuôi cấy trên môi trường thạch máu, không có khả năng di động và không sản sinh Indol. Có 81,67% số chủng *Cl. perfringens* phân lập được có khả năng sinh H₂S và 100% chủng có phản ứng CAMP ngược dương tính và có hoạt tính men lecithinase khi nuôi cấy trên môi trường thạch lòng đỏ trứng. Kiểm tra khả năng lên men đường cho thấy 100% các chủng đều có khả năng lên men đường glucose và lactose, có hai loại đường là arabinose và xylose thì không có chủng nào lên men.

So sánh kết quả giám định một số đặc tính sinh vật, hóa học của các chủng *Cl. perfringens* phân lập được từ lợn con mắc tiêu chảy cho thấy chúng đều mang các đặc điểm chung và điển hình của vi khuẩn *Cl. perfringens* như các tài liệu trong và ngoài nước đã mô tả.

3.3. Kết quả kiểm tra độc lực của một số chủng vi khuẩn *Cl. perfringens* phân lập được trên động vật thí nghiệm

Chúng tôi đã chọn ra 10 chủng *Cl. perfringens* để tiến hành kiểm tra độc lực trên chuột bạch. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4.: Kết quả kiểm tra độc lực của một số chủng *Cl. perfringens* phân lập được ở lợn con mắc tiêu chảy

TT	Ký hiệu chủng vi khuẩn	Số chuột chết/số tiêm (con)	Thời gian chuột chết (giờ)	Tỷ lệ (%)
1	C-TN02	2/2	18-24	100
2	C-TN05	1/2	24-30	50
3	C-TN14	1/2	24-30	50
4	C-BG05	2/2	18-24	100
5	C-BG10	1/2	18-24	50
6	C-BG20	2/2	24-30	100
7	C-VP06	1/2	36-48	50
8	C-VP09	2/2	18-24	100
9	C-VP17	1/2	24-30	50
10	C-VP20	2/2	24-30	100

Kết quả ở bảng 4 cho thấy cả 10 chủng vi khuẩn *Cl. perfringens* đều gây chết 100% số chuột được tiêm trong 18-48 giờ sau tiêm. Trong đó có 90% số chủng gây chết chuột từ 18-30 giờ, đặc biệt có 4 chủng (40%) có độc lực cao là C-TN02, C-BG05, C-BG10 và C-VP09 có thời gian gây chuột chết nhanh (từ 18-24 giờ), riêng chủng C-VP06 có thời gian gây chết chuột muộn hơn (từ 36 - 48 giờ). Các chuột chết bụng đều chướng to, có các bệnh tích như phổi viêm, xuất huyết trên bề mặt gan, lách sưng to, ruột xuất huyết, tim nhão. Lấy máu tim cấy vào môi trường yếm khí thì đều phân lập lại được vi khuẩn *Cl. perfringens* thuần khiết. Kết quả trên đã cho thấy các chủng vi khuẩn *Cl. perfringens* phân lập được từ lợn mắc tiêu chảy tại một số tỉnh phía Bắc đều có độc lực khá mạnh và là các nguyên nhân quan trọng trong hội chứng tiêu chảy của lợn từ sơ sinh đến 60 ngày tuổi. Kết quả của chúng tôi cũng tương đồng với kết quả của Trần Thị Hạnh và cs. (2002) khi nghiên cứu độc lực của các chủng vi khuẩn *Cl. perfringens* phân lập được ở lợn con tiêu chảy thấy hầu hết đều có độc lực mạnh và gây chết chuột trong 24 giờ.

3.4. Kết quả xác định khả năng miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn *Cl. perfringens* phân lập được

Chúng tôi đã tiến hành kiểm tra khả năng miễn cảm với kháng sinh các chủng vi khuẩn *Cl. perfringens* phân lập được với một số kháng sinh và hóa dược. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5: Kết quả kiểm tra khả năng miễn cảm của các chủng vi khuẩn *Cl. perfringens* phân lập được

TT	Kháng sinh/ hóa dược	Số chủng kiểm tra	Số chủng miễn cảm		Số chủng kháng	
			n	%	n	%
1	Amoxicillin	60	30	50,00	30	50,00
2	Kanamycin	60	19	31,67	41	69,33
3	Tetracyclin	60	6	10,00	54	90,00
4	Neomycin	60	0	0	60	100
5	Norfloxacin	60	0	0	60	100
6	Erythromycin	60	28	46,67	32	53,33
7	Streptomycin	60	0	0	0	0
8	Lincomycin	60	55	91,67	5	8,33
9	Ceftazidime	60	40	66,67	20	33,33
10	Enrofloxacin	60	5	8,33	55	91,67
11	Gentamicin	60	4	6,67	56	93,33
12	Penicillin G	60	57	95,00	3	5,00

Qua kết quả ở bảng trên cho thấy các chủng *Cl. perfringens* phân lập được miễn cảm cao với Penicillin G (95,00%), tiếp sau là Lincomycin (91,67%), miễn cảm kém hơn là Ceftazidime (66,67%). Một số kháng sinh khác có tỷ lệ vi khuẩn *Cl. perfringens* kháng lại là khá cao, trong đó cao nhất là Gentamicin (93,33%), tiếp đến là Enrofloxacin (91,67%), Tetracyclin (90,00%) và Kanamycin (69,33%). Nguyên nhân dẫn đến hiện tượng kháng thuốc của vi khuẩn như trên theo chúng tôi có thể là do người chăn nuôi dùng các loại thuốc kháng sinh điều trị bệnh lâu dài, không đúng liệu trình nên đã tạo cho vi khuẩn gây bệnh tính kháng lại một số kháng sinh và hóa dược. Từ kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi có thể lựa chọn kháng sinh phù hợp trong việc điều trị tiêu chảy do *Cl. perfringens* gây ra ở lợn con như Penicillin G, Lincomycin...

V. KẾT LUẬN:

Qua kết quả nghiên cứu thu được như trên, chúng tôi bước đầu có một số kết luận sau:

- Tỷ lệ phân lập vi khuẩn *Cl. perfringens* ở các mẫu phân lợn con mắc tiêu chảy tại một số tỉnh phía Bắc là 59,82% và ở lợn con bình thường là 26,78%. Các chủng *Cl. perfringens* phân lập được từ bệnh phẩm lợn có tỷ lệ cao nhất ở ruột già (66,67%), sau đó ở ruột non (61,90%) và thấp nhất là ở lách (14,28%)
- Các chủng *Cl. perfringens* phân lập được đều mang đầy đủ các đặc tính sinh học điển hình và có độc lực cao, gây chết 100% số chuột thí nghiệm từ 18-48 giờ sau tiêm với bệnh tích bụng chướng to, phổi viêm, xuất huyết bề mặt gan, lách sưng to, ruột xuất huyết, tim nhão. Lấy máu tim cấy vào môi trường yếm khí thì đều phân lập lại được vi khuẩn *Cl. perfringens*.
- Các chủng *Cl. perfringens* phân lập được mẫn cảm cao với Penicillin G (95,00%), tiếp sau là Lincomycin (91,67%); kháng lại một số kháng sinh như Gentamicin (93,33%), Enrofloxacin (91,67%), Tetracyclin (90,00%) và Kanamycin (69,33%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Hạnh, Đặng Xuân Bình (2002), "Chế tạo, thử nghiệm một số chế phẩm sinh học phòng trị bệnh tiêu chảy phân trắng ở lợn con do *E. coli* và *Cl. perfringens*". *Tạp chí KHKT Thú y*, 9 (1), tr. 19-29.
2. Nguyễn Ngọc Nhiên, Phạm Bảo Ngọc, Trần Thị Hạnh, Vũ Đình Hưng, Ngô Thị Nhu (1996), "Viêm ruột hoại tử ở hươu, nai do *Clostridium perfringens* và kết quả phòng bệnh bằng giải độc tố". *Tạp chí KHKT Thú y*, 3 (3), tr. 47-49.
3. Vũ Văn Ngũ (1979), *Loạn khuẩn đường ruột và tác dụng điều trị của Colisubtil*. Nxb Y học, Hà Nội.
4. Phan Thanh Phương, Trần Thị Hạnh, Phạm Thị Ngọc, Ngô Quang Hưng (1996), "Nghiên cứu xác định vai trò của vi khuẩn yếm khí *Clostridium perfringens* trong hội chứng tiêu chảy ở lợn". *Tạp chí Nông nghiệp & Công nghiệp thực phẩm* (12), tr. 495-496
5. Phạm Thế Sơn, Lê Văn Tạo, Cù Hữu Phú và Phạm Khắc Hiếu (2008), "Đặc tính của vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella spp.* và *Cl. perfringens* gây bệnh lợn con tiêu chảy". *Tạp chí KHKT Thú y*, 15 (I), tr. 73-77.