

MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VI KHUẨN *RIEMERELLA ANATIPESTIFER* CHỦNG HAN-RA2020 GÂY BỆNH BẠI HUYẾT Ở THỦY CẦM PHÂN LẬP TẠI HUNG YÊN

Nguyễn Thị Thu Vân¹, Nguyễn Thị Bích¹, Trần Văn Khánh¹,
Nguyễn Thanh Ba¹, Nguyễn Minh Chiến¹, Quách Thị Minh Hiền¹,
Nguyễn Văn Giáp², Huỳnh Thị Mỹ Lệ², Mai Thị Ngân²

TÓM TẮT

Bệnh bại huyết do vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* (RA) gây ra ở thủy cầm, gây thiệt hại kinh tế đáng kể cho ngành chăn nuôi vịt trên toàn thế giới do tỷ lệ chết cao và giảm tăng trọng. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá một số đặc tính sinh học của chủng *Riemerella anatipestifer* (chủng HAN-RA2020) gây bệnh bại huyết, phân lập từ vịt bệnh tại Hưng Yên năm 2020. Vi khuẩn RA chủng HAN-RA2020 phát triển tốt trên môi trường thạch sô cô la, mang đầy đủ các đặc trưng của vi khuẩn RA về tính chất nhân lên, đặc tính sinh hoá. Chủng HAN-RA2020 thuộc serotype 6, có mức tương đồng cao (100%) với các chủng vi khuẩn RA được báo cáo ở Trung Quốc các năm 2015, 2017, 2019. Chủng HAN-RA2020 mẫn cảm với tetracyclin, doxycyclin, enrofloxacin; kháng với ampicillin, oxytetracyclin, norfloxacin, gentamicin, colistin sulfate. Kết quả kiểm tra độc lực cho thấy chỉ số MLD của chủng HAN-RA2020 là 10^9 CFU/ml, gây bại huyết trên vịt với triệu chứng bệnh tích điển hình. Đồng thời, chủng HAN-RA2020 có tính sinh miễn dịch với tỷ lệ bảo hộ cao (100%), là đặc tính quan trọng cho việc lựa chọn chủng trong nghiên cứu sản xuất vaccin trong tương lai.

Từ khoá: *Riemerella anatipestifer*, vịt, HAN-RA2020, đặc tính sinh học.

Some biological characteristics of *Riemerella anatipestifer* HAN-RA2020 strain causing hemolytic anemia in waterfowl isolated in Hung Yen province

Nguyen Thi Thu Van, Nguyen Thi Bich, Tran Van Khanh,
Nguyen Thanh Ba, Nguyen Minh Chien, Quach Thi Minh Hien,
Nguyen Van Giap, Huynh Thi My Le, Mai Thi Ngan

SUMMARY

Riemerella anatipestifer (RA) infection in waterfowl causes serious economic losses in the duck industry due to high mortality and weight gain reduction. This study aimed to evaluate some biological characteristics of the RA strain isolated in Hung Yen province from ducks in 2020 (HAN-RA2020 strain). The HAN-RA2020 strain grew well on chocolate agar medium, having all biochemical characteristics of RA. The HAN-RA2020 strain belonged to serotype 6 and had 100% of similarity level in comparison with the RA strains reported in China in 2015, 2017, and 2019. The HAN-RA2020 strain was susceptible with tetracycline, doxycycline, enrofloxacin; resistant to ampicillin, oxytetracycline, norfloxacin, gentamicin, colistin sulfate. The result of testing virulence of this strain showed that the minimum lethal dose of the HAN-RA2020 strain was 10^9 CFU/ml, causing hemolytic activity in ducks with typical lesions. Also, the HAN-RA2020 strain had immunogenicity with a protection rate of 100%, which is an important characteristic in selection for vaccine production.

Keywords: *Riemerella anatipestifer*, ducks, HAN-RA2020, biological characteristics.

¹ Công ty Hanvet

² Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bại huyết do vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* (RA) gây ra ở các loài vịt, ngỗng, gà tây, chim nuôi và chim hoang dã lần đầu tiên được phát hiện bởi Riemer vào năm 1904 (Riemer, 1904). Bệnh có nhiều tên gọi khác nhau như: bệnh nhiễm trùng huyết ở vịt, hội chứng nhiễm trùng huyết ở thủy cầm, viêm thanh dịch truyền nhiễm. Lứa tuổi cảm nhiễm của bệnh chủ yếu là thủy cầm từ 1 đến 8 tuần tuổi (Leibovitz, 1972). Bệnh có thể xảy ra quanh năm nhưng thường gặp nhất là thời điểm chuyển mùa hoặc khi thời tiết thay đổi. Bệnh lây nhiễm trực tiếp từ thủy cầm ốm sang thủy cầm khỏe hoặc gián tiếp qua thức ăn nước uống, dụng cụ chăn nuôi, người chăn nuôi. Bệnh thường xảy ra ở dạng nhiễm trùng huyết cấp tính hoặc mạn tính với các đặc điểm như viêm ngoại tâm mạc có fibrin, viêm bề mặt gan, viêm túi khí, viêm vòi trứng có casein và viêm màng não (Leibovitz, 1972). Tỷ lệ mắc bệnh cao từ 20 - 80%, tỷ lệ tử vong có thể lên tới 5 - 20% (Hess *et al.*, 2013). Bệnh gây ra những thiệt hại kinh tế đáng kể cho ngành chăn nuôi vịt trên toàn thế giới do tỷ lệ chết cao và giảm tăng trọng. Ở Việt Nam, bệnh bại huyết cũng đã được ghi nhận (Liên K.T.L và Hiền H.N., 2018).

RA là thành viên của họ Flavobacteriaceae, vi khuẩn gram âm, không di động, không bào tử (Riemer, 1904); phát triển tốt trong môi trường thạch sô cô la, thạch máu và tryptic soy agar (TSA). Vi khuẩn phát triển tối ưu sau 18-24 giờ khi ủ ở 37°C với 5% CO₂. Các khuẩn lạc trên môi trường thạch máu có đường kính 1 - 2 mm, lồi, tròn, trong suốt, lấp lánh. Gen *16S rRNA* đã được báo cáo là gen xác định vi khuẩn RA gây bệnh bại huyết trên vịt (Tsai *et al.*, 2005). RA có 21 serotype (kiểu huyết thanh) đã biết nhưng không có bảo hộ chéo giữa các serotype (Pathanasophon *et al.*, 2002). Có thể đồng nhiễm hai hay nhiều serotype trong cùng một trại, lứa ấp. Hiện tại, một số loại vaccin vô hoạt chứa các chủng gây bệnh thuộc serotype 1, 2 và 5 đã được sử dụng trên thị trường. Tuy nhiên, do không có bảo hộ chéo giữa các serotype của các chủng RA khác nhau, nên các nghiên cứu về đặc tính sinh học của các chủng RA khác nhau phân lập từ thực địa tạo chủng gốc để sản xuất vaccin phòng bệnh là rất cần

thiết. Việc xác định serotype huyết thanh của chủng RA lưu hành giúp thu thập thông tin dịch tễ học, hỗ trợ trong lựa chọn chủng sản xuất vaccin, lựa chọn loại vaccin nhằm nâng cao hiệu quả của công tác kiểm soát nhiễm trùng RA. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá một số đặc tính sinh học của chủng RA phân lập tại Hưng Yên từ vịt bệnh năm 2020 (ký hiệu HAN-RA2020).

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

2.1. Nội dung

Đánh giá các đặc tính nuôi cấy, đặc tính sinh học và đặc tính di truyền của chủng vi khuẩn HAN-RA2020 phân lập được từ vịt mắc bệnh.

2.2. Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn HAN-RA2020 được phân lập từ mẫu bệnh phẩm từ vịt bệnh tại Hưng Yên năm 2020. Chủng RA đối chứng dương là chủng HAN-RA2019 do phòng thí nghiệm công ty Hanvet cung cấp được phân lập tại miền Bắc Việt Nam năm 2019.

Nguyên liệu dùng cho phản ứng PCR: môi xuôi, môi ngược gen *16S rRNA* (Integrated DNA Technologies, USA); bộ kit PCR, Go Taq® Green Master Mix, 2X (Promega, USA); thang DNA 100 bp gel loading buffer (Invitrogen, Promega, USA).

Các loại môi trường nuôi cấy từ công ty Merck, Đức: Brain heart infusion broth (BHI), Tryptic soya agar (TSA), Blood agar (BA), MacConkey agar (MC).

Các loại kháng sinh của hãng Oxoid (MA, USA): tetracycline 30µl, ampicillin 2µg, oxytetracycline 30µg, norfloxacin 10µg, colistin sulfate 50µg, gentamicin 30µg, amoxycillin clavulanic acid 2:1 30µg, doxycyclin 30µg, enrofloxacin 5µg.

Nguyên liệu dùng cho xác định đặc tính sinh học theo TCVN 8600-40: 2016: môi trường nước pepton, thuốc thử Kovac's, thuốc thử H₂O₂ 3%, thuốc thử Tetramethyl-P phenylene diamin hydrochloride 1%, môi trường nước Pepton – đường, môi trường sắt ba đường – TSI (Trip-

sugar Iron agar). Bộ 16 serotype huyết thanh chuẩn RA được sản xuất bởi công ty Ceva Biovac.

Vịt 7 ngày tuổi, khỏe mạnh, chưa tiêm vaccin phòng bệnh bại huyết do RA.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Nuôi cấy vi khuẩn

Chủng RA nghiên cứu được nuôi cấy trên các môi trường lòng BHI, môi trường thạch máu và thạch sô cô la, và thạch MacConkey ở điều kiện 37°C và 5% CO₂ trong 18-24 giờ. Quan sát tính chất mọc, hình thái, màu sắc của khuẩn lạc và khả năng gây dung huyết.

2.3.2. Giám định vi khuẩn bằng PCR

DNA tổng số của mẫu vi khuẩn kiểm tra được tách chiết bằng kit WizPrep Viral DNA/RNA Mini kit V2 (Wizbiosolutions Inc, Korea) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng PCR đặc hiệu được sử dụng nhằm giám định sự có mặt của vi khuẩn RA bằng cặp mồi 669AF/669AR dựa theo tiêu chuẩn quốc gia về bệnh động vật của Việt Nam ban hành năm 2016 (TCVN 8400-40:2016) và kit GoTaq® G2 Master Mixes (Promega, WI, USA). Đối chứng dương là chủng vi khuẩn RA do phòng thí nghiệm công ty Hanvet cung cấp (HAN-RA2019). Sản phẩm PCR được chạy điện di trên thạch agarose 1,2%.

Bảng 1. Trình tự mồi sử dụng cho phản ứng PCR đặc hiệu phát hiện RA

Tên mồi	Gen đích	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm (bp)	Chu trình nhiệt PCR
669AF	16S rRNA	TTACCGACTGATTGCCTTCTAG	546	- 94°C - 2 phút - 35 chu kỳ: 94°C - 30 giây, 54°C - 30 giây, 72°C - 30 giây - 72°C - 10 phút
669AR		AGAGGAAGACCGAGGACATC		

2.3.3. Giải trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn RA và phân tích đặc điểm di truyền

DNA tổng số của chủng vi khuẩn HAN-RA-2020 đã được giám định dương tính với phản ứng PCR đặc hiệu được tách chiết và sử dụng làm khuôn để khuếch đại

vùng gen 16S rRNA với cặp mồi 16S27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 16S1429R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') có kích thước sản phẩm khoảng 1.500 bp (Zhang *et al.*, 2016). Thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng được tóm tắt ở bảng 2.

Bảng 2. Thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng PCR khuếch đại gen 16S rRNA

Thành phần	Thể tích (μl)	Chu trình nhiệt
Go taq green mastermix 2 X	20	- 95°C - 5 phút - 30 chu kỳ: 94°C- 30 giây, 55°C- 30 giây, 72°C- 2 phút - 72°C -10 phút
PCR Water	14	
Mồi xuôi	2	
Mồi ngược	2	
DNA tổng số	2	

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%. Băng có kích thước phù hợp được tinh sạch và giải trình tự theo nguyên lý của Sanger. Trình tự được đọc và chỉnh sửa bằng phần mềm BioEdit version 7.2.5 (Alzohairy, 2011). Trình tự

được đối chiếu với cơ sở dữ liệu trên Ngân hàng Gen (GenBank) bằng công cụ nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Trình tự tham chiếu của một số chủng vi khuẩn RA công bố trước đó được thu thập trên GenBank.

Sử dụng công cụ Clustal W từ phần mềm MEGA 11 để căn chỉnh các trình tự gen. Bằng thuật toán Neighbor Joining tree với hệ số bootstrap 1000, cây phát sinh loài cho chủng HAN-RA2020 và chủng HAN-RA2019 đã được xây dựng.

2.3.4. Kiểm tra đặc tính sinh học

Đặc tính sinh hoá xác định theo tiêu chuẩn TCVN 8400-40:2016 cho vi khuẩn RA, bao gồm phản ứng sinh indol, phản ứng catalase, phản ứng oxidase, đặc tính lên men đường (glucose, sucrose, lactose và manitol), khả năng phân giải urê, sinh H_2S trên môi trường TSI.

2.3.5. Định type huyết thanh học

Thu khuẩn lạc của vi khuẩn RA trên môi trường thạch sô cô la khuấy đều trong 0,5 ml PBS tạo kháng nguyên phản ứng. Lấy 30 μ l huyết thanh chuẩn của mỗi serotype RA nhỏ lên phiến kính. Tiếp theo, lấy 30 μ l kháng nguyên nhỏ vào giọt huyết thanh trên phiến kính và trộn đều, lắng nhẹ trong 30 giây. Đọc kết quả: trên phiến kính hỗn dịch kháng nguyên-kháng thể xuất hiện hạt ngưng kết nhỏ li ti tăng dần số lượng đến 30 giây quan sát là phản ứng dương tính; hỗn dịch kháng nguyên-kháng thể đồng nhất, không tạo hạt ngưng kết sau 30 giây quan sát là phản ứng âm tính.

2.3.6. Xác định tính miễn cảm của chủng HAN-RA2020

Tính miễn cảm của chủng HAN-RA2020 với một số loại kháng sinh được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên thạch thông qua kết quả đo đường kính vòng vô khuẩn (Liên K.T.L và Hiền H.N., 2018).

2.3.7. Kiểm tra độc lực của chủng HAN-RA2020

Thí nghiệm kiểm tra độc lực của chủng HAN-RA2020 được thực hiện trên vịt 7 ngày tuổi, khỏe mạnh. Chủng HAN-RA2020 được nuôi cấy trong môi trường nước thịt BHI ở 37°C, 5% CO_2 trong 18- 24 giờ. Sau nuôi cấy số lượng vi khuẩn/ml canh trùng được xác định bằng cách đếm số CFU trên thạch máu ở độ pha

loãng khác nhau. Dựa vào số vi khuẩn trong canh trùng, tạo các nồng độ vi khuẩn 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} CFU/ml. Tiến hành tiêm cho vịt 7 ngày tuổi, mỗi nồng độ tiêm cho 10 con vịt với liều 0,5 ml/con/tiêm bắp. Riêng nhóm 10 con vịt đối chứng tiêm 0,5 ml NaCl 0,9%/con/tiêm bắp.

Theo dõi vịt thí nghiệm hàng ngày trong vòng 14 ngày, đánh giá các triệu chứng lâm sàng, vịt chết được mổ khám, phân lập lại vi khuẩn gây bệnh. Sau thời gian theo dõi, xác định liều tối thiểu gây chết 100% vịt thí nghiệm (MLD). Số lần thí nghiệm lặp lại là 3 lần.

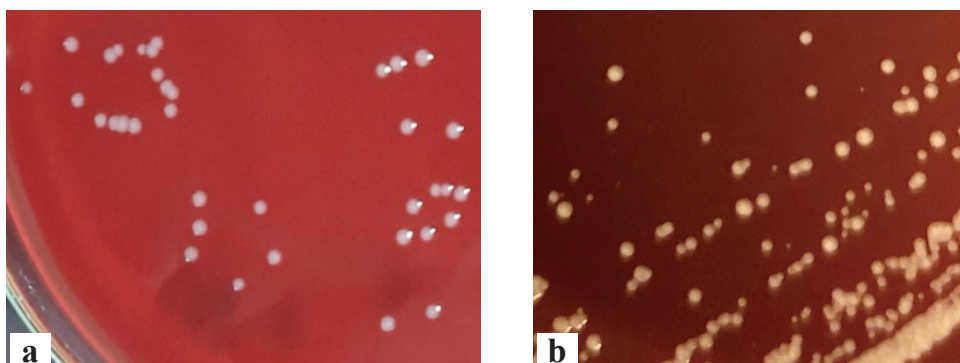
2.3.8. Kiểm tra hiệu lực của chủng HAN-RA2020

Vô hoạt vi khuẩn bằng formol 0,4%; sau đó phối trộn kháng nguyên đã bất hoạt với bột trợ nhũ dầu sao cho trong 0,5 ml vaccin chứa 1MLD vi khuẩn đã xác định, kiểm tra vô khuẩn và an toàn mẫu thử, sau đó đánh giá hiệu lực theo TCVN 8683-33:2019. Cụ thể, 30 vịt 7 ngày tuổi được chia thành 2 nhóm: nhóm thí nghiệm 20 con, tiêm vaccin chứa 1MLD liều 0,5 ml/tiêm bắp; nhóm đối chứng 10 con tiêm nước muối sinh lý liều 0,5ml/tiêm bắp. Sau hai tuần, vịt ở cả hai nhóm được tiêm nhắc lại với liều lượng và đường tiêm như lần 1. Ba tuần sau mũi tiêm lần 2 toàn bộ vịt nhóm 1 và nhóm 2 được công thử thách với vi khuẩn HAN-RA2020 mỗi con 1 MLD/tiêm bắp. Theo dõi toàn bộ vịt thí nghiệm trong 10 ngày. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả kiểm tra tính chất mọc của vi khuẩn RA

Vi khuẩn RA chủng HAN-RA2020 mọc yếu trên môi trường BHI, không có cặn ở đáy, lắc ống có vẩn nhẹ; trên môi trường thạch máu không gây dung huyết; phát triển tốt hơn trên môi trường thạch sô cô la. Trên môi trường thạch MacConkey, vi khuẩn không mọc. Khuẩn lạc có kích thước từ 1 đến 2mm, màu trắng, nhầy, hơi ướt, rìa gọn, không dung huyết (hình 1).

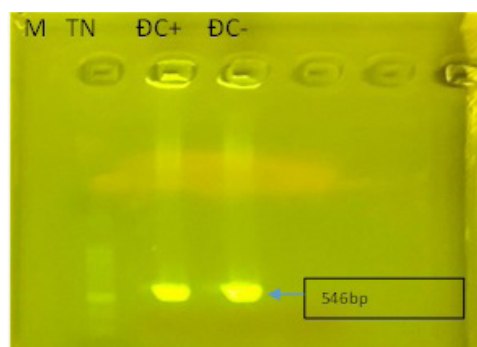


Hình 1. Khuẩn lạc vi khuẩn HAN-RA2020 trên môi trường thạch máu (a) và thạch sô cô la (b)

3.2. Kết quả giám định vi khuẩn RA bằng phản ứng PCR

3.2.1. Xác định vi khuẩn RA bằng phương pháp PCR

Giám định vi khuẩn RA chủng HAN-RA2020 bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu 669AF/669AR theo tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8600- 40: 2016 cho thấy chủng HAN-RA2020 cho sản phẩm PCR duy nhất là một vạch có kích thước khoảng 546bp giống như đối chứng dương (hình 2).



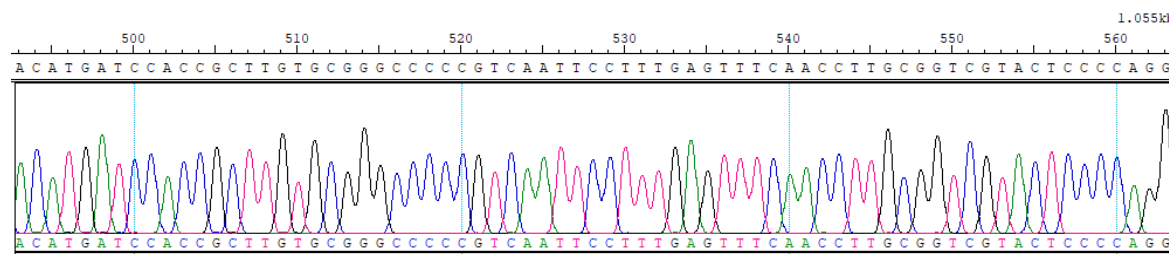
Hình 2. Sản phẩm PCR giám định vi khuẩn HAN-RA2020

Ghi chú: M: Marker 1000bp, TN: chủng phân lập HAN-RA2020, ĐC+: chủng vi khuẩn RAHAN-RA2019, ĐC-: Đối chứng âm.

3.2.2. Giải trình tự gen 16S rDNA vi khuẩn RA

Để nhận diện chính xác, DNA tổng số của chủng HAN-RA2020 giám định được tách chiết và sử dụng cặp mồi 16S27F/16S1429R

(Zhang *et al.*, 2016) để khuếch đại vùng gen 16S rRNA của vi khuẩn, sau đó được tinh sạch và giải trình tự. Kết quả giải trình tự được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Một phần giản đồ giải trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn HAN-RA2020

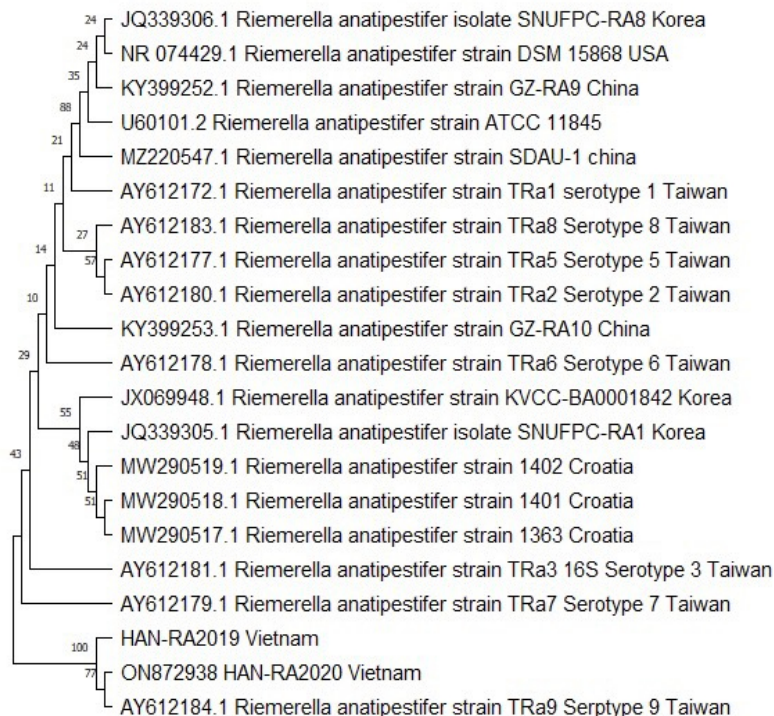
Để xác định danh pháp đến mức loài, các chủng vi khuẩn sau khi thực hiện phản ứng PCR sẽ tiến hành giải trình tự nucleotide ở đoạn gen *16S rRNA*. Giải trình tự nucleotide gen *16S rRNA* là kỹ thuật sinh học phân tử được ứng dụng phổ biến để xác định các loài vi khuẩn (Patel, 2001).

3.2.3. Kết quả so sánh sự tương đồng nucleotide gen *16S rRNA* của chủng HAN-RA2020

Trình tự nucleotide của chủng HAN-RA2020 sau khi giải mã tiến hành so sánh với các chủng vi khuẩn được lưu trữ trên GenBank. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen *16S rRNA* của chủng HAN-RA2020 với các chủng trên GenBank

Ký hiệu chủng	Loài vi khuẩn	Mã số lưu trữ trong GenBank	Năm	Mức độ tương đồng – ID (%)
RA-LZ-01	<i>Riemerella anatipestifer</i>	CP045564	2019	100
GZ-RA9	<i>Riemerella anatipestifer</i>	KY399252	2017	100
GZ-RA8	<i>Riemerella anatipestifer</i>	KY399225	2017	100
GZ-RA5	<i>Riemerella anatipestifer</i>	KY399248	2017	100
GZ-RA2	<i>Riemerella anatipestifer</i>	KY399245	2017	100
GZ-RA1	<i>Riemerella anatipestifer</i>	KY399244	2017	100
Yb2	<i>Riemerella anatipestifer</i>	CP007204	2015	100
17	<i>Riemerella anatipestifer</i>	CP007503	2015	100



Hình 4. Cây phát sinh loài chủng vi khuẩn HAN-RA2020

Kết quả so sánh cho thấy trình tự nucleotide dài 1.500bp gen *16S rRNA* của chủng vi khuẩn HAN-RA2020 trong nghiên cứu này có mức tương đồng cao nhất là 100% với các chủng vi khuẩn RA được báo cáo ở Trung Quốc các năm 2015, 2017, 2019 (RA-LZ-01, GZ-RA9, GZ-RA8, GZ-RA5, GZ-RA2, GZ-RA1, Yb2, 17) từ dữ liệu gen của GenBank. Trình tự *16S rRNA* của chủng HAN-RA2020 cũng đã được đăng tải trên GenBank (Mã số: ON872938) và sự tương đồng gen của chủng HAN-RA2020, HAN-RA2019 và một số chủng RA đang lưu hành trên thế giới cũng đã được so sánh (hình 4). Kết quả cho thấy chủng HAN-RA2020 có quan hệ gần với chủng HAN-RA2019 và hình thành cụm với chủng RA TRa9 của Đài Loan.

3.3. Kết quả giám định một số đặc tính sinh học của chủng HAN-RA2020

Các đặc tính sinh hoá của chủng vi khuẩn HAN-RA2020 được xác định theo tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8400-40:2016 (bảng 4).

Bảng 4. Kết quả kiểm tra một số đặc tính sinh hoá của chủng HAN-RA2020

Đặc tính sinh hóa	RA (theo TCVN- 40: 2016)	Chủng HAN-RA2020
Sinh indol	±	-
Lên men glucose	-	-
Lên men lactose	-	-
Lên men sucrose	-	-
SinhH ₂ S	-	-
Lên men manitol	-	-
Sử dụng urê	±	+
Phản ứng catalase	+	+
Phản ứng oxidase	+	+

Kết quả cho thấy, các đặc tính sinh học của chủng HAN-RA2020 phù hợp với đặc điểm của vi khuẩn RA theo tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8400-40:2016.

3.4. Kết quả định type huyết thanh học của chủng HAN-RA2020

Chủng vi khuẩn HAN-RA2020 được định

type huyết thanh học bằng bộ 16 serotype chuẩn (bảng 5).

Bảng 5. Kết quả định type huyết thanh học của chủng HAN-RA2020

TT	Serotype	Chủng HAN-RA2020
1	A	-
2	G	-
3	1	-
4	2	-
5	5	-
6	6	+
7	7	-
8	8	-
9	9	-
10	10	-
11	11	-
12	12	-
13	13	-
14	14	-
15	15	-
16	16	-

Kết quả trên cho thấy chủng HAN-RA2020 trong nghiên cứu này được xác định thuộc serotype 6. Các đợt bùng phát dịch do RA gây ra bởi các serotype 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14 và 15 cũng đã được báo cáo ở Trung Quốc (Wang *et al.*, 2015).

3.5. Kết quả kiểm tra tính miễn cảm của chủng HAN-RA2020 với một số loại kháng sinh

Kết quả kiểm tra tính miễn cảm cho thấy chủng HAN-RA2020 miễn cảm với tetracycline, doxycyclin, enrofloxacin; và kháng với ampicillin, oxytetracyclin, norfloxacin, gentamicin, colistin sulfate. Tình trạng kháng kháng sinh của RA cũng đã được công bố trong các nghiên cứu trước. RA phân lập được từ vịt bệnh tại tỉnh Bến Tre (62 chủng) miễn cảm cao với tetracycline, doxycycline, flofenicol, ceftiofur, cefotaxime và đề kháng với spectinomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, streptomycin, erythromycin (Liên K.T.L và Hiền H.N., 2018). Kết quả kiểm tra 185 chủng RA phân lập ở Hungary từ năm

2000 đến 2014 cho thấy RA kháng với các loại kháng sinh: ampicillin, doxycycline, register-floxacin, erythromycin, florfenicol, flumequine, gentamicin, penicillin, spectinomycin, streptomycin, sulphamethoxazole - trimethoprim, hợp chất sulphonamide và các hợp chất tetrachonamide; mẫn cảm với florfenicol, ampicillin, penicillin, sulphamethoxazole - trimethoprim và

spectinomycin (Gyuris *et al.*, 2017).

3.6. Kết quả kiểm tra độc lực của chủng HAN-RA2020

Xác định độc lực chủng HAN-RA2020 trên vịt bằng chỉ số MLD - liều tối thiểu gây chết 100% vịt.

Bảng 6. Kết quả xác định chỉ số MLD của chủng HAN-RA2020

Liều gây nhiễm trung bình	Tổng số vịt chết/tổng số vịt gây nhiễm	Tỷ lệ chết (%)	Kết quả phân lập lại vi khuẩn
$1,16 \times 10^{10}$ CFU/0,5 ml	30/30	100	+
$1,03 \times 10^9$ CFU/0,5 ml	30/30	100	+
$1,12 \times 10^8$ CFU/0,5 ml	26/30	86,7	+
$1,1 \times 10^7$ CFU/0,5 ml	21/30	70,0	+
$1,08 \times 10^6$ CFU/0,5 ml	06/30	20,0	+
Đối chứng	0/30	0,0	-

Kết quả cho thấy chỉ số MLD của chủng HAN-RA2020 là 10^9 CFU/ml. Vịt sau gây nhiễm có triệu chứng lâm sàng và bệnh tích điển hình của bệnh bại huyết do RA gây ra như tiêu chảy phân xanh, mất cân bằng, mất khả năng di chuyển, chảy nước mắt, nước mũi, viêm tơ huyết ở xoang bao tim, bề mặt gan và các túi khí. Các triệu chứng thường xuất hiện từ 24 giờ sau nhiễm và chết trong vòng 3 đến 7 ngày. Kết quả phân lập lại vi khuẩn từ vịt chết cho kết quả dương tính với vi khuẩn RA. Cho đến nay đã có nhiều nghiên cứu về độc lực của vi khuẩn RA, tuy nhiên tùy từng chủng mà độc lực của chúng cũng rất khác nhau: LD₅₀ của chủng YL4 (serotype 1) là $4,70 \times 10^6$ CFU/ml; chủng YB2 (serotype 2) là $1,07 \times 10^5$ CFU/ml; chủng HXb2 (serotype 10) là 82 CFU/ml (Liu *et al.*, 2013); LD₅₀ của chủng WJ4 là $5,43 \times 10^8$; chủng Th4 là $6,35 \times 10^7$; chủng YXb2 là $3,54 \times 10^6$ CFU/ml (Han *et al.*, 2012).

3.7. Kết quả kiểm tra hiệu lực của chủng HAN-RA2020

Bảng 7. Kết quả kiểm tra hiệu lực của chủng HAN-RA2020

Liều miễn dịch	Tổng số vịt sống/Tổng số vịt gây nhiễm	Tỷ lệ bảo hộ (%)
1×10^9 CFU/0,5 ml/vịt	60/60	100
Đối chứng	0/30	0

Kết quả cho thấy sau công thử thách nhóm vịt được miễn dịch từ chủng HAN-RA2020 có tỷ lệ bảo hộ là 100% với liều 1×10^9 CFU/0,5 ml/vịt. Có nhiều nghiên cứu về vaccin RA, trong đó phải kể đến vaccin vô hoạt R.A 3 giá (3 chủng type R.A) của Viện nghiên cứu thú y Thượng Hải, Viện hàn lâm khoa học nông nghiệp Trung Quốc, Trung tâm nghiên cứu gia cầm Trường đại học thú y Sichuan, Trung Quốc. Vaccin dùng 3 chủng R.A type 1, 2, 10 để chế tạo cho kết quả bảo hộ 100% vịt được tiêm miễn dịch 2 lần khi công cường độc với 3 LD₅₀ của 3 chủng. Vaccin gây miễn dịch trung gian tế bào tốt, và kháng thể đạt tới 1/3200 đến 1/6400 hiệu giá, kháng cả 3 type khi đánh giá bằng ELISA (Liu *et al.*, 2013).

IV. KẾT LUẬN

Vi khuẩn RA chủng HAN-RA2020 phát triển tốt trên môi trường thạch sô cô la, mang các đặc trưng của vi khuẩn RA về tính chất mọc, đặc tính sinh học. Chủng HAN-RA2020 thuộc serotype 6, có mức tương đồng cao 100% với các chủng vi khuẩn RA được báo cáo ở Trung Quốc các năm 2015, 2017, 2019. HAN-RA2020 mẫn cảm với tetracyclin, doxycyclin, enrofloxacin; kháng với ampicillin, oxytetracyclin, norfloxacin, gentamicin, colistin sulfate. Chỉ số MLD của chủng HAN-RA2020 là 10^9 CFU/ml; gây bại huyết trên vịt với triệu chứng, bệnh tích đặc trưng. Chủng HAN-RA2020 có tính sinh miễn dịch với tỷ lệ bảo hộ là 100% ở liều 1×10^9 CFU/vịt, đây là đặc tính quan trọng cho việc lựa chọn chủng trong nghiên cứu sản xuất vacxin trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alzohairy, A. M., 2011. *BioEdit: An important software for molecular biology*.
2. Gyuris, É., Wehmann, E., Czeibert, K., & Magyar, T., 2017. Antimicrobial susceptibility of *Riemerella anatipestifer* strains isolated from geese and ducks in Hungary. *Acta Vet Hung*, 65(2), 153-165. doi:10.1556/004.2017.016
3. Han, X., Hu, Q., Ding, S., Chen, W., Ding, C., He, L., Yu, S., 2012. Identification and immunological characteristics of chaperonin GroEL in *Riemerella anatipestifer*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93(3), 1197-1205. doi:10.1007/s00253-011-3635-2
4. Hess, C., Enichlmayr, H., Jandreski-Cvetkovic, D., Liebhart, D., Bilic, I., & Hess, M., 2013. *Riemerella anatipestifer* outbreaks in commercial goose flocks and identification of isolates by MALDI-TOF mass spectrometry. *Avian Pathol*, 42(2), 151-156. doi:10.1080/03079457.2013.775401
5. Leibovitz, L., 1972. A survey of the so-called "anatipestifer syndrome". *Avian Dis*, 16(4), 836-851.
6. Liên, K. L. T., & Hiền, H. N., 2018. Bệnh bại huyết trên vịt do *Riemerella anatipestifer* gây ra tại tỉnh Bến Tre. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54, 90-97. doi:10.22144/ctu.jsi.2018.070
7. Liu, H., Wang, X., Ding, C., Han, X., Cheng, A., Wang, S., & Yu, S., 2013. Development and evaluation of a trivalent *Riemerella anatipestifer*-inactivated vaccine. *Clin Vaccine Immunol*, 20(5), 691-697. doi:10.1128/cvi.00768-12
8. Patel, J. B., 2001. *16S rRNA* gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn*, 6(4), 313-321. doi:10.1054/modi.2001.29158
9. Pathanasophon, P., Phuektes, P., Tanticharoenyos, T., Narongsak, W., & Sawada, T., 2002. A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. *Avian Pathol*, 31(3), 267-270. doi:10.1080/03079450220136576
10. Riemer, O., 1904. Short communication about an exudative septicaemia observed in geese and its causative agent. *Zentralblatt Bakteriologie Originale*, 37, 641-648.
11. Tsai, H.-J., Liu, Y.-T., Tseng, C.-S., & Pan, M.-J. (2005). Genetic variation of the *ompA* and *16S rRNA* genes of *Riemerella anatipestifer*. *Avian Pathology*, 34(1), 55-64.
12. Wang, X., Ding, C., Han, X., Wang, S., Yue, J., Hou, W., Yu, S., 2015. Complete genome sequence of *Riemerella anatipestifer* serotype 1 strain CH3. *Genome announcements*, 3(1), e01594-01514. doi:10.1128/genomeA.01594-14
13. Zhang, D., He, W., Tong, Q., Zhou, J., & Su, X., 2016. Multi-omics analysis on the pathogenicity of *Enterobacter cloacae* ENHKU01 isolated from sewage outfalls along the Ningbo coastline. *Proteome Science*, 14(1), 15. doi:10.1186/s12953-016-0104-y

Ngày nhận 8-6-2022

Ngày phản biện 13-7-2022

Ngày đăng 1-9-2022