

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG, ĐỘC LỰC VÀ ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA CHỦNG VI KHUẨN *RIEMERELLA ANATIPESTIFER* PHÂN LẬP TỪ VỊT BỊ BỆNH NHIỄM TRÙNG HUYẾT TẠI VIỆT NAM

Lê Đình Hải*, Đặng Văn Tuấn, Vũ Khắc Hùng, Tăng Mạnh Nhật
 Phân viện Thú y miền Trung
 *Tác giả liên hệ email: dinhhaipvty@gmail.com

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, 3 chủng vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* (RA) phân lập từ vịt mắc bệnh nhiễm trùng huyết đã được lựa chọn để đánh giá khả năng sinh trưởng, độc lực và gây đáp ứng miễn dịch trên vịt. So sánh khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn này trên 3 loại môi trường thông dụng là BHI, TSB và LB cho thấy cả 3 chủng vi khuẩn RA đều phát triển tốt nhất trên môi trường BHI, đạt từ 10,9 tỷ tế bào/ml dịch nuôi cấy. Độc lực của 3 chủng vi khuẩn RA trên vịt có sự khác nhau, liều LD₅₀ trên vịt con 4 tuần tuổi thấp nhất là 48 x10⁶ và cao nhất là 360 x10⁶. Cả 3 chủng vi khuẩn đều có khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên vịt thí nghiệm. Kiểm tra hiệu giá kháng thể bằng phản ứng ELISA cho thấy, sau khi tiêm 2 liều kháng nguyên gây miễn dịch cách nhau 14 ngày, hiệu giá kháng thể đạt được sau 28 ngày tính từ liều miễn dịch đầu tiên đạt mức 9 -11 log₂. Bên cạnh đó, 90 đến 100% vịt được tiêm 2 liều kháng nguyên gây miễn dịch được bảo hộ khi công cường độc với liều 5LD₅₀/vịt. Kết quả của nghiên cứu này tạo cơ sở khoa học để lựa chọn chủng vi khuẩn giống tiềm năng cho việc nghiên cứu phát triển vaccin phòng bệnh nhiễm trùng huyết ở vịt.

Từ khóa: Vịt, đáp ứng miễn dịch, độc lực, *Riemerella anatipestifer*, vaccin.

Evaluating ability on growth, virulence and immune response of *Riemerella anatipestifer* bacteria isolated from septicemia ducks in Viet Nam

Le Dinh Hai, Dang Van Tuan, Vu Khắc Hùng, Tang Mạnh Nhật

SUMMARY

In this study, three strains of *Riemerella anatipestifer* (RA) isolated from septicemia ducks were selected for evaluating their ability of growing on artificial media, virulence as well as ability of inducing immune responses on the experimental ducks. The result of comparing the growth ability of these bacteria strains on 3 common media, such as: BHI, TSB and LB showed that all three strains of RA grew well on BHI medium, reaching 10.9x10⁹ CFU/ml. The virulence of the three tested RA strains in ducks was different, the lowest LD₅₀ dose in 4-week-old ducklings was 48x10⁶ and the highest was 360x10⁶. All three RA strains were able to induce immune response in the experimental ducks. Antibody titer in the ducks after receiving two immunity doses within 28 days reached around 9 to 11 log₂. Further more, 90-100% of the experimental ducks after receiving two immunity doses were protected when challenging duck with dose of 5LD₅₀ of the RA strains/duck. The findings of this study is a scientific basic for selecting the potential RA bacteria strains serving for future research on vaccine production.

Keywords: Ducks, immune response, virulence, *Riemerella anatipestifer*, vaccine.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh nhiễm trùng huyết hay còn gọi là bệnh bại huyết vịt là một bệnh truyền nhiễm trên vịt

nuôi, ngỗng, gà tây và một số loài gia cầm khác do vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* (RA) gây ra. Bệnh thường xảy ra ở thể cấp tính nhưng cũng

có thể ở thể mạn tính. Triệu chứng đặc trưng của bệnh là tiêu chảy phân xanh, chảy nước mũi, viêm hoại tử da vùng sau khớp gối, sưng phù đầu – cổ, ngoẹo cổ, rung đầu – cổ, viêm khớp, vịt đi lại khó khăn, dễ bị kích động, 2 chân duỗi ra như bơi (Li và cs., 2011). Sau khi xâm nhập vào cơ thể, vi khuẩn gây nên tình trạng nhiễm trùng máu, gây rối loạn đông máu, rối loạn tuần hoàn, hô hấp, viêm màng não mủ, viêm quanh gan, viêm màng ngoài bao tim, viêm túi khí. Gia cầm mắc bệnh bị suy gan, suy thận và các nội tạng khác của cơ thể làm cho con vật chết rất nhanh. Đối với gia cầm đẻ trứng, vi khuẩn RA gây viêm vòi trứng, giảm đẻ và ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng trứng (Chikuba và cs., 2016).

Trong những năm gần đây, bệnh nhiễm trùng huyết ở vịt do RA khá phổ biến ở nước ta. Bệnh có thể gây chết vịt từ 5-70% thậm chí có thể lên đến 100%. Điều này đã ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả chăn nuôi vịt (Bùi Hữu Dũng và cs., 2016; Lý Thị Liên Khai và cs., 2018; Võ Thành Thìn và cs., 2020). Để phòng và trị bệnh nhiễm trùng huyết do vi khuẩn RA gây ra, người chăn nuôi thường sử dụng kháng sinh. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây cũng cho thấy vi khuẩn RA cũng đã kháng lại nhiều loại kháng sinh nên việc điều trị bệnh thường không hiệu quả (Chen và cs., 2012). Chính vì vậy việc sử dụng vắc xin là một biện pháp hiệu quả để phòng bệnh nhiễm trùng huyết do vi khuẩn RA gây ra. Hiện nay trên thế giới đã có rất nhiều nghiên cứu sản xuất vắc xin phòng bệnh nhiễm trùng huyết và cũng đã có một số sản phẩm đã được lưu hành. Tuy nhiên, do sự đa dạng về các serotype nên hiệu quả phòng bệnh của vắc xin còn có một số hạn chế nhất định ở Việt Nam (Sandhu, 1979; Gamal và cs., 2021).

Cho đến hiện tại, có 21 serotype của vi khuẩn RA đã được ghi nhận trên thế giới. Ở Việt Nam, theo nghiên cứu của Võ Thành Thìn và cs. (2023), các serotype 1, 6, 8, 10 và 20 đã được tìm thấy ở các chủng vi khuẩn RA phân lập được. Bên cạnh đó, còn có nhiều chủng không thuộc vào các serotype trong số 21 serotype đã được công bố. Theo một số kết quả nghiên cứu, khả năng gây

đáp ứng miễn dịch bảo hộ chéo của các serotype khác nhau là khá yếu (Sandhu, 1979). Chính vì vậy, việc lựa chọn các chủng vi khuẩn RA phân lập từ thực địa tại Việt Nam để nghiên cứu sản xuất vắc xin phòng bệnh cho đàn vịt tại Việt Nam là hết sức cần thiết. Bên cạnh đó, để được chọn làm giống sản xuất vắc xin, các chủng phải có khả năng phát triển tốt trên môi trường nhân tạo, đặc biệt là có khả năng gây đáp ứng miễn dịch cao và có tính đại diện.

Từ những nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã lựa chọn được các chủng RA có mang các yếu tố độc lực, đại diện cho các vùng miền ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá sự sinh trưởng, độc lực và khả năng gây đáp ứng miễn dịch của các chủng vi khuẩn RA đại diện phân lập từ các vùng khác nhau ở Việt Nam.

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

2.1. Nguyên liệu

- Chủng vi khuẩn: 3 chủng vi khuẩn RA là những chủng có độc lực cao trên vịt được ký hiệu: chủng 1, chủng 2, chủng 3; các chủng vi khuẩn được phân lập từ vịt bị bệnh nhiễm trùng huyết ở các vùng khác nhau ở Việt Nam (Võ Thành Thìn và cs., 2020)

- Môi trường dùng trong nuôi cấy vi khuẩn RA: môi trường Brain Heart Infusion (BHI), Tryptic Soy Broth (TSB), Luria Bertani Broth (LB)

- Hóa chất: Dung dịch PBS, Skim milk, Anti-Duck Antibody, cơ chất (ABTS)

- Động vật thí nghiệm; vịt 0 đến 2 tuần tuổi không có kháng thể kháng lại vi khuẩn RA.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Đánh giá sự sinh trưởng, tạo sinh khối của vi khuẩn RA trên một số loại môi trường nhân tạo

- Xác định độc lực của chủng vi khuẩn RA trên vịt

- Xác định khả năng gây đáp ứng miễn dịch của chủng vi khuẩn RA.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Đánh giá/xác định sự sinh trưởng của vi khuẩn RA trên môi trường nhân tạo

Để tiến hành nghiên cứu sự sinh trưởng, tạo sinh khối, các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên các loại môi trường nhân tạo khác nhau gồm BHI, TSB và LB; trong điều kiện 37°C, lắc 120 vòng/phút. Sau 12 giờ nuôi cấy tiến hành đếm số bằng phương pháp pha loãng hệ số 10 và lắng mặt thạch đếm số lượng khuẩn lạc. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.3.2. Xác định độc lực của một số chủng vi khuẩn RA trên vịt

Độc lực của vi khuẩn RA được đánh giá bằng phương pháp xác định liều LD₅₀ theo phương pháp của Reed và Muench (1938). Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường BHI ở điều kiện 37°C, lắc 120 vòng/phút trong 12 giờ. Sau khi nuôi cấy 12 giờ, tiến hành đếm số lượng vi khuẩn bằng phương pháp lắng mặt thạch, đồng thời canh khuẩn được pha loãng theo hệ số 1/10 và tiêm bắp cho vịt lần lượt từ nồng độ 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, mỗi nồng độ tiêm cho 5 vịt 4 tuần tuổi, liều 1ml/con. Theo dõi, biểu hiện triệu chứng của vịt và ghi nhận số vịt chết trong khoảng thời gian 7 ngày sau khi gây nhiễm.

2.3.3. Xác định khả năng gây đáp ứng miễn dịch của vi khuẩn RA trên vịt

Chuẩn bị kháng nguyên: các chủng vi khuẩn RA được nuôi cấy riêng lẻ trong môi trường BHI trong điều kiện 37°C, lắc 120 vòng/phút. Sau 12 giờ nuôi cấy, tiến hành bất hoạt vi khuẩn bằng formaline với nồng độ 0,3% theo thể tích; sau khi bất hoạt 24 giờ, tiến hành kiểm tra tính thuần khiết và vô hoạt. Kháng nguyên đạt chỉ tiêu thuần khiết và vô hoạt được gây miễn dịch cho vịt.

Phương pháp gây miễn dịch: vịt 1 tuần tuổi được miễn dịch bằng vi khuẩn RA đã được bất hoạt với liều tiêm 10⁹ CFU/con, đường tiêm bắp thịt. Sau 14 ngày tiêm mũi 1, tiến hành tiêm nhắc lại cho vịt với liều và đường tiêm như lần 1. Mỗi chủng vi khuẩn được tiêm cho 10 vịt và 10 vịt khác làm đối chứng được tiêm nước sinh lý với thể tích tương tự. Khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của các chủng được đánh giá bằng phương pháp

ELISA và phương pháp công cường độc sau 14 ngày tiêm nhắc lại.

Phản ứng ELISA được thực hiện theo mô tả Zhang và cs. (2014) và được tóm tắt như sau: đĩa 96 giếng được phủ bằng kháng nguyên ly giải vi khuẩn RA, ủ 24 giờ ở 4°C. Sau đó, rửa đĩa 3 lần bằng PBST (PBS + 0,5% Tween 20) và block các giếng bằng 2% skim milk trong PBS ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Bổ sung huyết thanh vịt đã được pha loãng vào các giếng, ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Sau khi rửa lại các giếng 4 lần bằng PBST tiến hành bổ sung Anti-Duck Antibody vào các giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Loại bỏ dung dịch trong đĩa, rửa tất cả các giếng 4 lần bằng PBST. Bổ sung ABTS vào tất cả các giếng với thể tích 150 µl/giếng. Ủ đĩa 30 đến 60 phút ở nhiệt độ phòng, đọc kết quả ở bước sóng 450nm. Bên cạnh đó, tất cả vịt đều được công cường độc bằng vi khuẩn RA với liều 5LD₅₀/con.

2.3.4. Xử lý số liệu

Các số liệu thống kê được xử lý bằng phần mềm MS Excel 2016. Sự sai khác giữa các giá trị được xem là có ý nghĩa thống kê khi $p \leq 0,05$.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định khả năng phát triển của các chủng vi khuẩn RA trên môi trường nhân tạo

Trong nghiên cứu này, ba loại môi trường là BHI, TSB và LB được lựa chọn để kiểm tra khả năng phát triển tạo sinh khối của 3 chủng vi khuẩn RA. Kết quả đánh giá khả năng phát triển của 3 chủng vi khuẩn RA trên các loại môi trường khác nhau được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, trên môi trường BHI các chủng vi khuẩn đạt được nồng độ trung bình là 10,9 tỷ CFU/ml canh khuẩn. Khi nuôi cấy trên môi trường TSB số lượng vi khuẩn đạt trung bình đạt 8,2 tỷ CFU/ml canh khuẩn. Trên môi trường LB vi khuẩn đạt số lượng 6,9 tỷ CFU/ml canh khuẩn. So sánh khả năng phát triển trên 3 loại môi trường cho thấy, vi khuẩn RA phát triển tốt nhất trên môi trường BHI, tiếp theo là môi trường TSB và thấp nhất là môi trường LB. Sự sai khác này là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 1. Kết quả so sánh khả năng phát triển của các chủng RA

Môi trường nuôi cấy	Số lượng vi khuẩn x 10 ⁹ CFU/ml (± SD)			Trung bình x 10 ⁹ CFU/ml (± SD)
	Chủng 1	Chủng 2	Chủng 3	
BHI	11,3 (± 1,4)	10,6 (± 1,3)	10,9 (± 0,98)	10,9 (± 1,4)
TSB	8,2 (± 1,0)	8,1 (± 0,5)	8,2 (± 0,7)	8,2 (± 0,8)
LB	6,7 (± 0,4)	7,2 (± 0,7)	7,1 (± 1,0)	6,9 (± 0,7)

Trên cùng mỗi một loại môi trường và điều kiện nuôi cấy, khả năng phát triển của mỗi chủng vi khuẩn RA biến động từ 8,8 – 13 tỷ CFU/ml canh khuẩn đối với BHI; 7,4 – 9,6 tỷ CFU/ml đối với TSB và 5,8 – 8,2 tỷ CFU/ml đối với LB trong những lần nuôi cấy khác nhau. Khi so sánh khả năng phát triển của 3 chủng trên cùng một loại môi trường, kết quả cho thấy sự sai khác về khả năng phát triển của các chủng là không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, vi khuẩn RA phát triển tốt nhất trên môi trường BHI so với môi trường TSB và LB.

3.2. Kết quả kiểm tra độc lực của các chủng vi khuẩn RA

Kết quả xác định độc lực trên vịt 4 tuần tuổi cho thấy, liều LD₅₀ của 3 chủng vi khuẩn RA được xác định trong nghiên cứu này có sự khác nhau khá rõ rệt, thấp nhất là 48 x10⁶ CFU/con, tiếp đến là 170 x10⁶ CFU/con và cao nhất được xác định là 360 x10⁶ CFU/con (bảng 2). Mặc dù cả 3 chủng này đều phân lập được từ vịt có triệu chứng nghi mắc bệnh nhiễm trùng huyết do vi khuẩn RA, tuy nhiên khi xác định liều LD₅₀ trên vịt lại cho thấy có sự khác nhau. Điều này cho thấy rằng, các chủng RA khác nhau có độc lực ở mức độ khác nhau nhưng vẫn có khả năng gây bệnh nhiễm trùng huyết cho vịt.

Bảng 2. Kết quả xác định LD₅₀ của các chủng vi khuẩn RA

Chủng vi khuẩn RA	Đường tiêm	Liều LD ₅₀ (CFU/con)
Chủng 1	Bắp thịt	170 x10 ⁶
Chủng 2	Bắp thịt	48 x10 ⁶
Chủng 3	Bắp thịt	360 x10 ⁶

Một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy liều LD₅₀ của các chủng RA khác nhau thì khác nhau. Theo Liu và cs. (2013), liều LD₅₀ của chủng YL4 là 4,70×10⁶ CFU/con; chủng YB2 là 1,07×10⁵ CFU/con. Theo Yuan và cs. (2019), chủng CH-1 có liều LD₅₀ trên vịt là 1,44 x 10⁸ CFU/con; chủng vi khuẩn Yb2 có liều LD₅₀ trên vịt là 1,53 × 10⁵ CFU/con (Wang và cs., 2016). Từ những kết quả nghiên cứu cho thấy, liều LD₅₀ của các chủng vi khuẩn RA trên vịt biến động từ 10⁵ đến 10⁸ CFU/con. Sự khác biệt này có thể do một số yếu tố như: serotype, yếu tố độc lực của vi khuẩn, điều kiện nuôi cấy... Bên cạnh đó thì vịt thí nghiệm ở các nghiên cứu khác nhau, trong điều kiện khác nhau cũng có thể dẫn đến kết quả LD₅₀ của các chủng khác nhau. Hiện nay, một số gen liên quan đến độc lực của vi khuẩn RA đã được xác định như *ompA*, *AS87_01735*, *gldK*, *M949_1360*, *hagA1*, *sspA*, *prtC*.... Tuy nhiên, vai trò cụ thể của các yếu tố này chưa được xác định rõ (Vo và cs., 2023; Chang và cs., 1998; Hu và cs., 2011).

3.3. Kết quả đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch của vi khuẩn RA trên vịt

Khả năng gây đáp ứng miễn dịch của các chủng vi khuẩn RA là một đặc tính sinh học quan trọng cần được đánh giá để lựa chọn chủng tiềm năng phục vụ nghiên cứu phát triển vaccin phòng bệnh nhiễm trùng huyết ở vịt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn 3 chủng vi khuẩn RA phân lập được từ vịt mắc bệnh nhiễm trùng huyết, các chủng vi khuẩn này đã được xác định có độc lực, có khả năng gây bệnh nhiễm trùng huyết, gây chết vịt ở các liều khác nhau để tiến hành nghiên cứu đánh giá khả năng tạo đáp ứng miễn dịch bảo hộ trên vịt, từ

đó lựa chọn làm chủng giống sản xuất vaccin phòng bệnh. Kết quả xác định hiệu giá kháng

thể kháng vi khuẩn RA ở vịt thí nghiệm bằng phương pháp ELISA được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Hiệu giá kháng thể của vịt được gây miễn dịch bằng các chủng vi khuẩn RA

Chủng vi khuẩn RA	Lô thí nghiệm	Số vịt (con)	Liều miễn dịch	Hiệu giá kháng thể $\log_2 (\pm SD)$	
				14 ngày	28 ngày
Chủng 1	Miễn dịch	10	10^9 CFU/con	6,17 ($\pm 0,69$)	9,67 ($\pm 1,2$)
	Đối chứng	10	Nước sinh lý	1,17 ($\pm 0,37$)	1,50 ($\pm 0,50$)
Chủng 2	Miễn dịch	10	10^9 CFU/con	5,83 ($\pm 0,69$)	10,0 ($\pm 0,8$)
	Đối chứng	10	Nước sinh lý	1,00 ($\pm 0,58$)	1,33 ($\pm 0,47$)
Chủng 3	Miễn dịch	10	10^9 CFU/con	5,17 ($\pm 1,34$)	10,3 ($\pm 0,47$)
	Đối chứng	10	Nước sinh lý	1,3 ($\pm 0,47$)	2 ($\pm 0,81$)

Kết quả đánh giá khả năng tạo đáp ứng miễn dịch bằng phương pháp ELISA cho thấy, chỉ sau 14 ngày được tiêm liều miễn dịch đầu tiên, tất cả vịt thí nghiệm đều có kích thích đáp ứng miễn dịch gây sản sinh kháng thể kháng vi khuẩn RA trong máu. Hiệu giá kháng thể của những vịt được tiêm miễn dịch dao động quanh mức 5 đến $7 \log_2$, trong khi đó hiệu giá kháng thể ở vịt đối chứng chỉ ở 0 đến $2 \log_2$ (bảng 3). Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Như vậy, với chỉ 1 liều tiêm miễn dịch, sau 2 tuần thì tất cả 3 chủng vi khuẩn RA đều có khả năng kích thích tạo đáp ứng miễn dịch trên vịt với hiệu giá kháng thể khá cao.

Kiểm tra hiệu giá kháng thể sau khi tiêm miễn dịch mũi tăng cường sau 14 ngày, tức là 28 ngày sau khi tiêm mũi miễn dịch đầu tiên cho thấy hiệu giá kháng thể trong huyết thanh của vịt được tiêm miễn dịch tăng rất cao, từ 9 đến $11 \log_2$; cao hơn 16 lần so với hiệu giá kháng thể tại thời điểm 14 ngày sau khi tiêm 1 liều miễn dịch đầu tiên (bảng 3). Như vậy cả 3 chủng vi khuẩn RA trong nghiên cứu này đều có tính kháng nguyên cao, kích thích vịt thí nghiệm tạo được đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể kháng vi khuẩn RA cao trong máu. Khả năng tạo được đáp ứng miễn dịch này hoàn toàn có thể đáp ứng yêu cầu để làm giống tiềm năng nghiên cứu phát triển vaccin. So sánh khả năng gây đáp ứng miễn dịch của 3 chủng cho

thấy, hiệu giá kháng thể ở vịt được tiêm với kháng nguyên của 3 chủng là khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Tiến hành công cường độ tất cả vịt được tiêm miễn dịch cùng với vịt đối chứng với các chủng vi khuẩn RA tương ứng để kiểm tra khả năng bảo hộ vịt. Kết quả cho thấy, cả 3 nhóm vịt đã được tiêm miễn dịch bằng các chủng vi khuẩn RA khác nhau đều được bảo hộ từ 90% đến 100%. Trong khi đó, nhóm vịt đối chứng khi được công cường độ bằng các chủng vi khuẩn RA có tỷ lệ sống rất thấp, chỉ từ 10% đến 20% (bảng 4). Sự khác biệt về tỷ lệ sống khi công cường độ giữa vịt được tiêm miễn dịch so với vịt đối chứng là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (bảng 4).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau khi công cường độ tất cả vịt đối chứng đều biểu hiện triệu chứng đặc trưng của bệnh nhiễm trùng huyết như ủ rũ, tiêu chảy phân xanh, rối loạn vận động, chảy nước mũi, ngoẹo cổ (hình 1). Những vịt chết được mổ khám cho thấy bệnh tích đặc trưng đó là viêm quanh gan, viêm màng ngoài bao tim (hình 1). Tất cả vịt chết đều phân lập được vi khuẩn RA ở trong máu và não của vịt. Như vậy, có thể thấy rằng cả 3 chủng vi khuẩn RA trong nghiên cứu này đều có khả năng tạo được đáp ứng miễn dịch bảo hộ khi công bằng chủng vi khuẩn tương ứng.

Bảng 4. Đánh giá khả năng tạo đáp ứng miễn dịch bảo hộ bằng phương pháp công cường độc trên vịt

Chủng vi khuẩn RA	Lô thí nghiệm	Số vịt (con)	Liều công (LD ₅₀)	Số vịt sống/ chết	Tỷ lệ sống (%)
Chủng 1	Miễn dịch	10	5	9/1	90
	Đối chứng	10	5	2/8	20
Chủng 2	Miễn dịch	10	5	10/0	100
	Đối chứng	10	5	1/9	10
Chủng 3	Miễn dịch	10	5	10/0	100
	Đối chứng	10	5	2/8	20

**Hình 1. Triệu chứng và bệnh tích của vịt sau khi công cường độc**

Vi khuẩn RA gây bệnh nhiễm trùng huyết là một nguyên nhân quan trọng gây thiệt hại kinh tế đối với ngành chăn nuôi vịt. Theo Zang và cs. (2014), bệnh nhiễm trùng huyết gây thiệt hại cho ngành chăn nuôi vịt ở Trung Quốc ước tính khoảng 200 triệu đô la mỗi năm. Do hiện nay vi khuẩn RA đã kháng lại nhiều loại kháng sinh, nên việc sử dụng kháng sinh để phòng và trị bệnh sẽ không mang lại hiệu quả. Chính vì vậy phòng bệnh bằng vaccin là biện pháp tốt nhất nhất. Cho đến hiện tại đã có nhiều nghiên cứu về vaccin

phòng bệnh nhiễm trùng huyết ở vịt do vi khuẩn RA gây ra. Tuy nhiên, việc phát triển vaccin phòng bệnh do vi khuẩn RA đang gặp phải một số khó khăn đó là sự đa dạng về các serotype của vi khuẩn RA và khả năng hạn chế về miễn dịch chéo giữa các serotype khác nhau. Chính vì vậy mà việc phát triển một loại vaccin đa giá là hết sức cần thiết. Trong nghiên cứu này, 3 chủng vi khuẩn RA được phân lập ở Việt Nam đại diện cho các vùng miền khác nhau, có một số đặc tính sinh học khác nhau cũng như là khác nhau

về serotype nhưng đều có khả năng gây đáp miễn dịch tốt. Đây sẽ là tiền đề để phát triển một loại vaccin đa giá có hiệu quả phòng bệnh nhiễm trùng huyết ở vịt do vi khuẩn RA gây ra tại Việt Nam.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự kết quả nghiên cứu của một số tác giả trong và ngoài nước. Theo Nguyễn Thị Thu Vân và cs. (2022), khi miễn dịch cho vịt bằng vi khuẩn RA chủng HAN-RA2020 với liều 10^9 CFU/vịt, kết quả cho thấy vịt có khả năng bảo hộ 100% sau khi công cường độc bằng chủng vi khuẩn RA tương đồng. Theo Pornpen Pathanasophon và cs. (1996), vịt 2 tuần tuổi khi được miễn dịch bằng 5×10^9 vi khuẩn RA, vịt miễn dịch có khả năng bảo hộ cao hơn 95,6% so với vịt đối chứng sau khi công cường độc.

Việc phát triển vaccin đa giá cũng đã được một số tác giả trên thế giới nghiên cứu. Theo Liu (2013), khi kết hợp 3 chủng vi khuẩn RA gồm 3 serotype là 1, 2 và 10 để tạo ra một loại vaccin đa giá với chất bổ trợ là Montanide ISA 70 VG. Vịt sau khi miễn dịch với vaccin đa giá có khả năng bảo hộ cao đối với cả 3 serotype 1, 2 và 10. Trong nghiên cứu này, mặc dù chúng tôi chưa đánh giá khả năng bảo hộ chéo của 3 chủng cũng như là sự kết hợp 3 chủng. Tuy nhiên, đây là những chủng mà chúng tôi lựa chọn từ những serotype khác nhau và phổ biến ở Việt Nam từ nghiên cứu trước. Chính vì vậy, sau khi kết hợp 3 chủng này để sản xuất vaccin đồng thời kết hợp với một số chất bổ trợ có thể tạo ra được một loại vaccin có hiệu quả cao phòng bệnh nhiễm trùng huyết ở vịt tại Việt Nam.

IV. KẾT LUẬN

Cả 3 chủng vi khuẩn RA đều phát triển tốt nhất trên môi trường BHI so với 2 loại môi trường khác là TSB và LB; đạt từ $10,9$ tỷ CFU/ml.

Cả 3 chủng vi khuẩn RA đều có độc lực, có khả năng gây chết vịt, liều LD_{50} trên vịt con 4 tuần tuổi thấp nhất là 48×10^6 và cao nhất là 360×10^6 CFU/con.

Cả 3 chủng vi khuẩn RA đều có khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên vịt thí nghiệm, hiệu giá kháng thể đạt được sau khi tiêm 2 liều kháng nguyên đạt từ 9 đến 11 log₂. Vịt được miễn dịch có khả năng bảo hộ cao, tỷ lệ sống đạt từ 90–100% khi sau khi công cường độc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Hữu Dũng, Đỗ Tiến Duy, Nguyễn Tất Toàn, Nguyễn Thị Thu Năm, Lê Thanh Hiền, Nguyễn Thị Phước Ninh, 2016. Xác định sự hiện diện Duck circovirus và *Riemerella anatipestifer* từ các ca bệnh bại huyết trên vịt bằng kỹ thuật PCR. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, 23(6), 14-21.
2. Lý Thị Liên Khai và Nguyễn Hiền Hậu, 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 (số chuyên đề: Nông nghiệp), 90-97.
3. Võ Thành Thìn, Đặng Văn Tuấn, Lê Đình Hải, 2020. Phân lập vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* từ mẫu bệnh phẩm vịt có triệu chứng nghi mắc bệnh nhiễm trùng huyết. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, (3), 26-31.
4. Võ Thành Thìn, Đặng Văn Tuấn, Lê Đình Hải, 2023. Serotype và một số gen mã hóa yếu tố độc lực của vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* phân lập từ vịt mắc bệnh nhiễm trùng huyết ở Việt Nam. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, (2), 35 -43.
5. Nguyễn Thị Thu Vân, Nguyễn Thị Bích, Trần Văn Khánh, Nguyễn Thanh Ba, Nguyễn Minh Chiến, Quách Thị Minh Hiền, Nguyễn Văn Giáp, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Mai Thị Ngân, 2022. Một số đặc tính sinh học của vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* chủng HAN-RA2020 gây bệnh bại huyết ở thủy cầm phân lập tại Hưng Yên. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, (6), 17-25.
6. Chang C.F., Hung, P.E., Chang, Y.F., 1998. Molecular characterization of a plasmid

- isolated from *Riemerella anatipestifer*. *Avian Pathology*, 27, 339-345.
7. Chen Y.P., Lee S.H., Chou C.H., And Tsai H.J., 2012. Detection of florfenicol resistance genes in *Riemerella anatipestifer* isolates from ducks and geese. *Vet. Microbiol.*, 154: 325-331
 8. Chikuba T., Uehara, H., Fumikura, S., Takahashi, K., Suzuki, Y., Hoshino, K., and Yamamoto, Y., 2016. *Riemerella anatipestifer* infection in domestic ducks in Japan, 2014. *J. Vet. Med. Sci.*, 78(10), 1635 – 1638.
 9. Gamal F.Z., Soliman E.M., El-Naggar H.M., Abd El-Moneim W.S., And Hassannin A.I., 2021. Trial for preparation and evaluation of combined inactivated vaccine for the protection against *Riemerella anatipestifer* and Avian Influenza (H5N1) in ducks. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, 9 (4): 490-499.
 10. Li J.X., Tang Y., Gao J.Y., Huang, C.H., and Ding, M.J., 2011. *Riemerella anatipestifer* infection in chickens. *Pak. Vet J.*, 31(1), 65 – 69.
 11. 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. *Clinical and vaccine immunology* : CVI 20, 691-697.
 12. Hu Q., Han X., Zhou X., Ding C., Zhu Y., Yu S., 2011a. OmpA is a virulence factor of *Riemerella anatipestifer*. *Veterinary Microbiology*, 150, 278-283.
 13. Pornpen Pathanasophon, Takuo Sawada, Tarika Pramoolsinsap and Tita Tanticharoenyos, 1996. Immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* broth culture bacterin and cell-free culture filtrate in ducks. *Avian Pathology* (1996) 25, 705-719.
 14. Reed L.J., Muench H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints, *American journal of Epidemiology*, Volume 27, Issue 3, page 493 – 497.
 15. Sandhu TS: 1979, Immunization of White Pekin ducklings against *Pasteurella anatipestifer* infection. *Avian Dis* 23:662–669.
 16. Vo TT, Dang VT, Le DH, Nguyen TH. Identification, serotyping, and antimicrobial susceptibility of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Vietnam. *Open Vet J.* 2022 May-Jun;12(3):391-398.
 17. Yu G., Wang X., Dou Y., Wang S., Tian, M., Qi, J., Li, T., Ding, C., Wu, Y., Yu, S., 2016. *Riemerella anatipestifer* M949_1360 gene functions on the Lipopolysaccharide biosynthesis and bacterial virulence. *PLoS One.*, doi: 10.1371/journal.pone.0160708.
 18. Zou J., Wang X., Tian M., Cao, S., Hou, W., Wang, S., Han, X., Ding, C., Yu, S.. 2015. The M949_1556 gene plays a role on the bacterial antigenicity and pathogenicity of *Riemerella anatipestifer*. *Vet Microbiol.*, 177(1-2), 193-200.
- Ngày nhận: 6-7-2023
 Ngày phản biện: 17-10-2023
 Ngày đăng: 1-3-2024