

**KẾT QUẢ PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH TỶ LỆ NHIỄM MYCOPLASMA
GALLISEPTICUM VÀ SALMONELLA TYPHIMURIUM Ở VỊT BẰNG KHÁNG
NGUYÊN TỰ CHẾ**

*Đào Thị Hảo¹, Văn Thị Hương¹, Nguyễn Xuân Huyền¹,
Nguyễn Thị Bích Thủy¹, Bùi Huy Hoàng²*

Tóm tắt

- Dùng kháng nguyên tự chế xác định tỷ lệ nhiễm *Mycoplasma gallisepticum* (MG) và *Salmonella typhimurium* ở huyết thanh vịt có biểu hiện lâm sàng của bệnh do Mycoplasma và Salmonella cho kết quả:

+ Tỷ lệ dương tính với kháng nguyên MG là 75,50% (151/200 mẫu).

+ Tỷ lệ dương tính với kháng nguyên S. typhimurium là 80% (160/200 mẫu).

- Bằng các phương pháp khác nhau (nuôi cấy, PCR ...) đã phân lập và xác định được:

+ 24 chủng *S. typhimurium* và 7 chủng *S. enteritidis* từ các cơ quan phủ tạng của 30 vịt bệnh và có phản ứng ngưng kết huyết thanh dương tính với kháng nguyên tự chế.

+ 8 chủng MG từ 30 mẫu phổi vịt bệnh.

Từ khóa: Vịt, *Mycoplasma gallisepticum*, *Salmonella typhimurium*, Tỷ lệ nhiễm, Kháng nguyên.

**Isolation and determination of the prevalence of *Mycoplasma gallisepticum*
and *Salmonella typhimurium* in ducks by the self-produced antigen**

*Đào Thị Hảo¹, Văn Thị Hương¹, Nguyễn Xuân Huyền¹,
Nguyễn Thị Bích Thủy¹, Bùi Huy Hoàng²*

Summary

Using self-produced antigen to determine prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Salmonella typhimurium* in ducks with clinical symptoms of mycoplasmosis and salmonellosis showed that the positive percentage of sera with MG antigen is 75.5% (151/200 samples) and that of sera with *S. typhimurium* is 80% (160/200 samples).

Isolation and identification of the two bacteria from organs of 30 diseased ducks by cultivation and PCR indicated 24 *S. typhimurium*, 7 *S. enteritidis* and 8 *M. gallisepticum* isolates.

Key words: Duck, *Mycoplasma gallisepticum*, *Salmonella typhimurium*, Prevalence, Antigen

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm xoang mũi trên vịt do nhiều loài Mycoplasma gây ra: *M. gallisepticum*, *M. anseris*, *M. imitans*, *M. anatis*, *M. glcophilum*, *M. lipofaciens*... (Stipkovits và Kempf, 1996); Bệnh Phó thương hàn ở vịt do vi khuẩn Salmonella sp. gây ra đặc biệt là *S. typhimurium*. Trong nghiên cứu này chúng tôi tập trung nghiên cứu vào vi khuẩn gây bệnh chủ yếu là *M. gallisepticum* (MG) và *S. typhimurium*.

Cả hai bệnh có vai trò quan trọng về dịch tễ, thiệt hại gây ra bao gồm vịt bị bệnh, tỷ lệ vịt con chết và loại thải cao, vịt chậm lớn tiêu tốn nhiều thức ăn, sức đề kháng bệnh giảm, ảnh hưởng đến chất lượng con giống, tỷ lệ ấp nở thấp, đặc biệt *S. typhimurium* còn là chủng vi khuẩn gây bệnh thương hàn nguy hiểm ở người.

Trên thực tế hiện nay, hầu hết các đàn vịt đều bị nhiễm bệnh do vi khuẩn Mycoplasma và Salmonella, vì vậy việc tạo ra một đàn vịt không bị nhiễm bệnh là một việc làm cần thiết nhưng gặp rất nhiều khó khăn. Cả hai bệnh này đều nằm trong danh sách giám sát kiểm tra huyết thanh định kỳ.

Xuất phát từ nhu cầu thực tế và dựa trên cơ sở những kết quả nghiên cứu đã đạt được trước đây, chúng tôi tiến hành nghiên cứu: “Phân lập và xác định tỷ lệ nhiễm *M. gallisepticum*, *S. typhimurium* ở huyết thanh vịt bằng kháng nguyên tự chế Viện Thú y”

¹Viện Thú y ² Cơ quan thú y Vùng VI

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

2.1 Nội dung nghiên cứu:

- Xác định tỷ lệ nhiễm *M. gallisepticum*, *S. typhimurium* trên đàn vịt có biểu hiện lâm sàng của bệnh do Mycoplasma và Salmonella bằng các kháng nguyên tự chế *M. gallisepticum* (KNTC MG) và *S. typhimurium* (KNTC Sal.typ)
- Phân lập, xác định vi khuẩn *M. gallisepticum*, *S. typhimurium* trên vịt có biểu hiện lâm sàng bị nhiễm Mycoplasma và Salmonella và có huyết thanh dương tính với KNTC MG và KNTC Sal.typ.

2.2 Nguyên liệu

- Các mẫu máu, phủ tạng của vịt bệnh.
- Kháng nguyên MG, kháng nguyên *S. typhimurium* chuẩn, kháng huyết thanh chuẩn đơn giá và đa giá của Viện Thú y Nhật Bản cung cấp.
- Kháng nguyên MG và kháng nguyên *S. typhimurium* tự chế của Bộ môn Vi trùng Viện Thú y.
- Các loại môi trường, hoá chất dùng trong nghiên cứu:
 - + Môi trường Mycoplasma Broth (MB), Mycoplasma Agar (MA); RV, DHL, TSI, Chrom™ Salmonella được chuẩn bị theo quy trình của Tổ chức Dịch tễ thế giới.
 - + Các cặp môi xác định MG và Salmonella của hãng Espec Oligo Service Corporation - Nhật Bản.
- Các loại hoá chất sử dụng trong phản ứng PCR
- Các máy móc và dụng cụ cần thiết khác trong phòng thí nghiệm.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp lấy và xử lý mẫu:

Các mẫu máu và vịt thí nghiệm được lấy từ những vịt đã được theo dõi và chọn lọc.

- Phương pháp phát hiện kháng thể

- Phản ứng ngưng kết nhanh trên phiến kính
- Phản ứng ngưng kết và ngăn trở ngưng kết hồng cầu gà

- Phương pháp xác định kháng nguyên

- Phản ứng immunoperoxidaza gián tiếp (Imada Y., 1982)

- Phương pháp xác định *M. gallisepticum* và *S. typhimurium* bằng phản ứng PCR

- Cặp môi đặc hiệu và các bước thực hiện phản ứng PCR xác định MG dựa theo quy trình của Kiss và cs (1997).

- Các cặp môi đặc hiệu và các bước thực hiện phản ứng PCR để xác định độc tố đường ruột (Stn), yếu tố xâm nhập (InvA) của Salmonella theo các điều kiện của Suzuki và cs (1994), Saitoh và cs (2005), Skyberg và cs (2006).

- Các phương pháp khác

Phương pháp nuôi cấy, phân lập vi khuẩn, phương pháp giám định vi khuẩn, phương pháp xác định serotyp của vi khuẩn theo hướng dẫn của Nhật Bản và theo phương pháp thường quy tại Bộ môn Vi Trùng - Viện Thú y.

- Phương pháp xử lý số liệu:

Các kết quả thu được trong các thí nghiệm được xử lý theo phương pháp thống kê sinh vật học thông thường và trên máy tính bằng chương trình Excel 7.0.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm *M. gallisepticum* và *S. typhimurium* trên đàn vịt có biểu hiện lâm sàng của bệnh do Mycoplasma và Salmonella bằng kháng nguyên tự chế

200 mẫu huyết thanh vịt lấy từ đàn đã được chọn lọc có biểu hiện lâm sàng của hai bệnh do Mycoplasma và Salmonella, tiến hành làm phản ứng ngưng kết với hai loại KNTC MG và KNTC Sal.typ. Kết quả được trình bày trong bảng .1.

Bảng 1. Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm *M. gallisepticum* và *S. typhimurium* trên đàn vịt có biểu hiện lâm sàng của bệnh do Mycoplasma và Salmonella bằng kháng nguyên tự chế

Số lượng mẫu huyết thanh vịt	KNTC MG		KNTC Sal.typ	
	(+)	%	(+)	%
200	151	75,50	160	80,00

Với tổng số 200 mẫu huyết thanh của vịt ở các tuần tuổi khác nhau có biểu hiện lâm sàng của bệnh do Mycoplasma và Salmonella mang xét nghiệm, số mẫu dương tính với KNTC MG là 151/200 mẫu (chiếm 75,50%), số mẫu dương tính với KNTC Sal.typ là 160/200 mẫu (chiếm 80,0%).

Từ kết quả đạt được cho thấy rằng việc sử dụng kháng nguyên kiểm tra phát hiện kháng thể *M. gallisepticum* và *S. typhimurium* trong huyết thanh vịt có giá trị thực tế cao, tỷ lệ mẫu dương tính cao là do đàn vịt đã được chọn lọc trước khi lấy máu xét nghiệm.

Tiếp đó, trong số 151 vịt có huyết thanh dương tính với KNTC MG và 160 vịt có huyết thanh dương tính với KNTC Sal.typ, chúng tôi lựa chọn 30 vịt có mẫu huyết thanh dương tính với cả hai loại kháng nguyên đem mổ khám để làm các thí nghiệm tiếp theo.

3.2 Kết quả phân lập vi khuẩn *M. gallisepticum* và *S. typhimurium* trên vịt có biểu hiện lâm sàng nhiễm Mycoplasma và Salmonella và có huyết thanh dương tính với kháng nguyên tự chế

Trước khi tiến hành phân lập, xác định vi khuẩn *M. gallisepticum* và *S. typhimurium*, chúng tôi tiến hành làm phản ứng ngưng kết của 30 mẫu huyết thanh vịt với hai loại KNTC MG và KNTC Sal.typ, có dùng KNC của hai loại kháng nguyên để so sánh. Kết quả cho thấy 30/30 mẫu huyết thanh đều dương tính với cả hai loại KNCMG, KNTCMG, KNCSal.typ, KNTCS.typ.

Sau đó chúng tôi lấy mẫu phổi, gan, lách, chất chứa ruột của 30 vịt bệnh để phân lập, xác định vi khuẩn *M. gallisepticum* và *S. typhimurium*.

3.2.1 Kết quả phân lập, xác định vi khuẩn *S. typhimurium* từ phủ tạng vịt bệnh

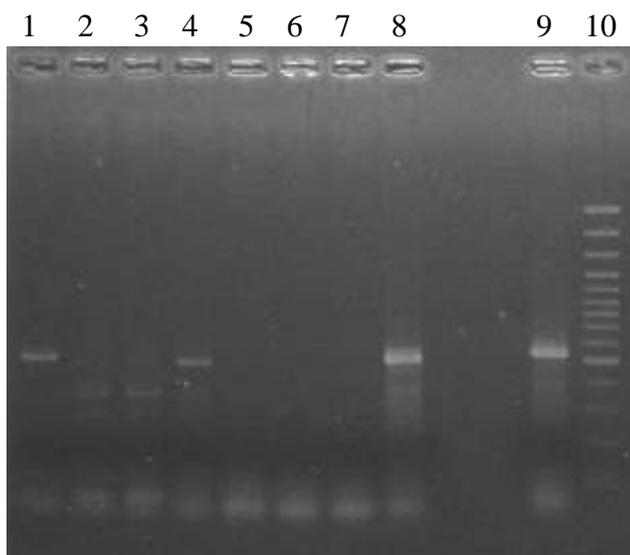
Tiến hành phân lập, xác định vi khuẩn Salmonella sp. từ các mẫu phủ tạng vịt bệnh bằng phương pháp nuôi cấy và kỹ thuật PCR cho kết quả như trong bảng 2.

Bảng 2 Kết quả phân lập, xác định vi khuẩn Salmonella sp. từ phủ tạng vịt bệnh

Loại bệnh phẩm	Số lượng mẫu	PCR		Nuôi cấy	
		(+)	(%)	(+)	(%)
Gan	30	13	43,33	10	33,33
Lách	30	13	43,33	11	36,67
Chất chứa ruột	30	15	50,00	13	43,30
Tổng	90	41	45,55	34	37,77

Kết quả cho thấy: Bằng phương pháp nuôi cấy, có 34 trong tổng số 90 mẫu phân lập được vi khuẩn Salmonella sp., chiếm tỷ lệ 37,77%; trong đó tỷ lệ phân lập được vi khuẩn này cao nhất ở các mẫu chất chứa ruột với 43,3% (13/30 mẫu), lách là 36,67% (11/30 mẫu) và gan là 33,33% (10/30 mẫu).

Bằng phương pháp PCR khi sử dụng cặp mồi InvA-F và InvA-R đã xác định được 41/90 mẫu dương tính với kích cỡ sản phẩm là 521 bp, trong đó cao nhất ở chất chứa ruột với tỷ lệ dương tính 50%.



Ảnh: Kết quả phản ứng PCR với cặp mồi InvA-F và InvA-R xác định vi khuẩn Salmonella.

Giếng 9: Đ/c dương; giếng 2: Đ/c âm; giếng 1, 4, 8: Mẫu dương tính, sản phẩm 521 bp

Sau khi phân lập được 34 chủng vi khuẩn Salmonella sp., chúng tôi tiến hành xác định serotyp của các chủng phân lập được bằng các phản ứng ngưng kết trên phiến kính và trong ống nghiệm, sử dụng kháng huyết thanh chuẩn (Nhật Bản) và đối chiếu theo bảng phân loại của Kauffmann and White (Popoff, 2001). Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xác định serotype của các chủng vi khuẩn Salmonella sp. phân lập được

Số chủng kiểm tra	Serotype	Công thức kháng nguyên			Số chủng (+)	Tỷ lệ (%)
		KN O	KN H			
			Pha1	Pha2		
n=34	<i>S. typhimurium</i>	4,5,12	i	1,2	25	73,53
	<i>S. enteritidis</i>	9,12	m,g	-	9	26,47

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, trong 34 chủng Salmonella sp. phân lập được có 25 chủng là *S. typhimurium* (73,53%), 9 chủng là *S. enteritidis* (26,47%). *S. typhimurium* xác định được với tỷ lệ cao trong nghiên cứu này càng khẳng định việc sử dụng KNTC Sal.typ để xác định tỷ lệ nhiễm vi khuẩn này là cần thiết và có ý nghĩa lớn trong công tác chẩn đoán.

Tiếp theo, chúng tôi sử dụng phương pháp PCR để xác định một số yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn Salmonella sp. phân lập được với cặp mồi Stn-F và Stn-R với kích cỡ sản phẩm là 259 bp, kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4 Kết quả kiểm tra độc tố đường ruột (Stn) của các chủng Salmonella phân lập được bằng phản ứng PCR

Chủng Salmonella	Số chủng kiểm tra	Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)
<i>S1 (chủng chuẩn)</i>	1	1	100,0
<i>S. typhimurium</i>	25	24	96,00
<i>S. enteritidis</i>	9	7	77,78

Kết quả cho thấy: Trong tổng số 25 chủng *S. typhimurium* được kiểm tra có 24 chủng mang gen Stn, 7/9 chủng *S. enteritidis* mang gen Stn. Từ kết quả này cho thấy hầu hết các chủng Salmonella phân lập có khả năng sản sinh yếu tố đường ruột, có thể là do chúng tôi phân lập được các chủng này từ những vịt đã được chọn lựa nghi phó thương hàn và có kết quả huyết

thanh dương tính ngưng kết với KNTC Sal.typ. Như vậy việc dùng KNTC Sal.typ để xác định việc nhiễm bệnh do Salmonella là một việc làm có ý nghĩa trong công tác chẩn đoán.

3.2.2 Kết quả phân lập, xác định vi khuẩn MG từ phổi vịt bệnh

Tiến hành phân lập, xác định vi khuẩn *M. gallisepticum* từ phổi của các vịt bệnh cho kết quả như ở bảng .5.

Bảng 5 Kết quả phân lập vi khuẩn MG từ bệnh phẩm vịt

Loại bệnh phẩm	Số lượng	PCR		Nuôi cấy			
		(+)	%	MB		MA	
				(+)	%	(+)	%
Phổi	30	13	43,33	23	76,66	8	26,66

Kết quả cho thấy với 30 mẫu phổi được kiểm tra bằng 3 phương pháp: PCR, nuôi cấy trên môi trường MB, MA đã xác định được tỷ lệ nhiễm MG lần lượt là 43,33% (13/30 mẫu), 76,66 (23/30 mẫu) và 26,66 (8/30 mẫu).

Sau khi nuôi cấy phân lập được 8 chủng MG từ mẫu phổi, chúng tôi tiến hành kiểm tra, giám định các đặc điểm của vi khuẩn bằng các phương pháp khác nhau, kết quả được trình bày ở bảng .6

Bảng .6 Kết quả giám định vi khuẩn MG phân lập

Chủng VK	Glu		RSA		IP		HI $\geq 1/8$		PCR 530 bp	
	SC	+	SC	+	SC	+	SC	+	SC	+
MGS ₆	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MG phân lập	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Glu: Glucoza; IP: Immunoperoxidaza

Kết quả bảng 3.6 cho thấy 8/8 chủng MG phân lập đều lên men đường Glucoza, cả 8 chủng đều bắt màu thuốc nhuộm tốt trong phản ứng IP giống với chủng chuẩn MGS₆; trong phản ứng HI dùng để xác định serotyp cả 8 chủng đều đạt HI 1/8 tương đương với chủng MGS₆; cả 8 chủng MG đều cho kết quả dương tính khi sử dụng kỹ thuật PCR, kết quả sản phẩm trên gel Agarose là 530 bp giống với chủng MGS₆ chuẩn.

Những kết quả thu được ở các phương pháp trên đi đến kết quả cuối cùng là hai loại vi khuẩn MG, Salmonella mà chúng tôi phân lập được đều có các đặc tính và cấu trúc ADN của các chủng vi khuẩn MG, Salmonella chuẩn.

Như vậy từ việc sử dụng hai loại KNTC xác định tỷ lệ nhiễm ban đầu đã đạt được kết quả trong công tác chẩn đoán phân lập và xác định được vi khuẩn gây bệnh. Đây chính là mục đích nghiên cứu của chúng tôi.

IV. KẾT LUẬN

- Sử dụng KNTC kiểm tra phát hiện kháng thể MG, Sal.typ trong huyết thanh vịt có biểu hiện lâm sàng của bệnh do Mycoplasma và Salmonella cho kết quả:

+ Tỷ lệ dương tính với KNMG là 151/200 mẫu, chiếm 75,50% .

+ Tỷ lệ dương tính với KN Sal.typ là 160/200 mẫu, chiếm 80%.

- Bằng phương pháp nuôi cấy, phân lập được 34/90 mẫu Sal sp. chiếm tỷ lệ 37,77%; trong đó 13/30 mẫu là chất chứa ruột phân lập được Sal sp. chiếm tỷ lệ 43,30%.

- Bằng phương pháp PCR khi sử dụng cặp mồi InvA-F và InvA-R đã xác định được 41/90 mẫu dương tính với Salmonella với kích cỡ sản phẩm là 521 bp, trong đó cao nhất là chất chứa ruột với tỷ lệ dương tính là 50%. 23/30 mẫu phổi dương tính MG với kích cỡ sản phẩm là 530 pb.

- Kết quả xác định serotyp của các chủng phân lập cho thấy trong 34 chủng Salmonella nghiên cứu, có 24 chủng là S.typ chiếm 73,53%, 7 chủng là S. enteritidis chiếm 26,47%. Từ 30 mẫu phổi vịt, có 8 mẫu phân lập được MG.

- KNTC MG, KNTC Sal.typ đáp ứng được yêu cầu dùng để xác định tỷ lệ nhiễm MG, Sal.typ bằng phản ứng ngưng kết nhanh trên các đàn vịt nuôi ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bela Toth (1985). Một số bệnh quan trọng của vịt (bản dịch).. Nhà xuất bản nông nghiệp Hà Nội, tr. 30- 34.
2. Frey. M.L., R.P.Hanson, and D.P.Anderson. (1968), A medium for the isolation of avian mycoplasmas. *Am. J. Vet. Res.*29, 2163-2171.
3. Đào Thị Hảo, Cù Hữu Phú, Đỗ Ngọc Thuý, Trần Việt Dũng Kiên, Lê Minh Hằng, Văn Thị Hương (2009). Chế tạo thử nghiệm và hoàn thiện kháng nguyên MG. Ứng dụng kháng nguyên MG tự chế xác định tỷ lệ nhiễm bệnh CRD tại một số cơ sở chăn nuôi gà. Báo cáo đề tài năm 2009, Viện Thú y.
4. Nguyễn Ngọc Huân , Trần Xuân Hạnh và Tô Thị Phần (2008). Sự lưu hành của Salmonella trên đàn vịt CV - supper M nuôi tại trại vịt giống VIGOVA . *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Chăn nuôi - Số 14-Tháng 10-2008*.
5. Kiss I, Matiz K, Kaszanyitzky E, Chavez Y, Johanson KE., (1997), Detection and identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction.
6. Đinh Nam Lâm và Phan Ngọc Anh (2002). “Bước đầu khảo sát tình hình nhiễm Salmonella trên vịt tại Cần Thơ”. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y, số 1, tr. 63-68*.
7. Trần Văn Thành , Nguyễn Quang Tuyên ,Trần Thị Hạnh , Lê Văn Dương (2010). Xác định và kiểm tra độc lực các chủng Salmonella Typhimurium , Salmonella Enteritidis phân lập được ở vịt nuôi tại tỉnh Hưng Yên. *KHKT Chăn nuôi, số 10 – 2010*.
8. Stipkovits L., Kempf I., (1996), Mycoplasmas in poultry, *Rev. Sci. Tech, 15[4], 1495 - 1525*.