

## MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA *SALMONELLA* SPP. PHÂN LẬP TỪ LỢN CON SAU CAI SỮA MẮC HỘI CHỨNG TIÊU CHẢY TẠI MỘT SỐ TRANG TRẠI NUÔI THEO QUY MÔ CÔNG NGHIỆP Ở MIỀN BẮC

### Characterization of Salmonella Serotypes from Postweaning Pigs with Diarrhea in Some Industrial Farms in Northern Vietnam

Nguyễn Mạnh Phương<sup>1,2</sup>, Nguyễn Bá Tiếp<sup>2</sup>, Văn Thị Hương<sup>3</sup>, Cù Hữu Phú<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Học viên cao học, <sup>2</sup>Khoa Thú y Trường Đại học Nông Nghiệp Hà Nội

<sup>3</sup>Bộ môn Vi trùng, Viện Thú y Quốc gia

Địa chỉ email tác giả liên hệ: nbtiep@hua.edu.vn

Ngày gửi bài: 12.01.2012

Ngày chấp nhận: 10.04.2012

#### TÓM TẮT

*Salmonella* spp. phân lập từ phân và cơ quan nội tạng lợn con sau cai sữa bị tiêu chảy từ 9 trang trại chăn nuôi công nghiệp tại 6 tỉnh miền Bắc được xác định thuộc 5 serotyp. Trong các chủng phân lập được, *S. typhimurium* chiếm tỷ lệ cao nhất (51,61%) tiếp theo là *S. anatum* (19,35%), *S. agona* (16,14%), *S. meleagridis* và *S. ruzizi* (cùng có tỷ lệ 6,45%). Tất cả các chủng phân lập được kháng streptomycin; đa số chủng kháng amoxicillin, ampicillin, sulfatrimethoprim và tetracyclin. Tất cả các chủng đều có độc lực cao. Các serotyp phân lập được mang gen quy định độc tố (*stn*) và yếu tố xâm nhập (*invA*) với tỷ lệ cao trong đó 100% số chủng *S.typhimurium* mang cả hai gen *stn* và *invA*. Kết quả cho thấy cần chú ý vai trò của *S.typhimurium* trong hội chứng tiêu chảy của lợn nuôi theo quy mô công nghiệp ở miền Bắc.

Từ khóa: Lợn con sau cai sữa, miền Bắc, *Salmonella*, serotyp, tiêu chảy

#### SUMMARY

*Salmonella* isolates from faeces and organs of postweaning pigs with diarrhea in 9 industrial farms in 6 northern provinces of Vietnam comprised 5 serotypes. *S. typhimurium* serotype made up 51.61% of the isolates, followed by *S. anatum* (19.35%), *S. agona* (16.14%), *S. meleagridis* and *S. ruzizi* (6.45% for each serotype). All of the isolates were resistant to streptomycin and most of them were resistant to tetracyclin, amoxicillin, ampicillin and sulfatrimethoprim along with very high virulence. The *stn* gene coding for enterotoxin production and *invA* gene coding for invasion factor were detected in most of the isolates. These two genes were detected in all of the *S. typhimurium* isolates. The results indicated that *S. typhimurium* may play an important role in diarrhea symptom of pigs in the northern provinces of Vietnam.

Keywords: Diarrhea, Northern Vietnam, piglet, *Salmonella*

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phương thức chăn nuôi năng suất cao đã dẫn đến những biến đổi đặc tính sinh học của vi khuẩn *Salmonella* ở lợn (Foley và cs., 2008). Những chỉ tiêu được quan tâm để đánh giá mức độ biến đổi của vi khuẩn bao gồm tỷ lệ lưu hành các serotype, đặc tính

sinh hóa, độc lực, khả năng đề kháng với các tác nhân hóa học đặc biệt là thuốc sát trùng và kháng sinh (EMEA, 2006).

Nhiều nghiên cứu ở Việt Nam cho thấy có sự khác nhau về tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở các lứa tuổi lợn (Nguyễn Bá Hiên, 2001; Trương Quang và Trương Hà Thái, 2007) và giữa các đối tượng lợn nuôi (Trương Quang,

2004). Ngoài ra, độc lực của *Salmonella* phân lập từ lợn bình thường và lợn bị tiêu chảy được xác định có sự khác biệt trên động vật thí nghiệm (Trương Quang, 2004; Trương Quang và Trương Hà Thái, 2007). Các nghiên cứu trước đây cho thấy hai serotyp nhiễm ở lợn với tỷ lệ cao nhất trong số các serotyp của các chủng *Salmonella* phân lập được từ các đối tượng lợn nuôi ở miền Bắc. là *S. choleraesuis* (Lê Văn Tạo và Nguyễn Thị Vui, 1994; Tạ Thị Vịnh và Đặng Khánh Vân, 1996) và *S. enteritidis* (Trịnh Tuấn Anh và cs., 2010). Hiện nay ở nước ta, mặc dù tỷ lệ đóng góp của sản phẩm chăn nuôi quy mô công nghiệp ngày càng tăng nhưng chưa có nhiều nghiên cứu về vi khuẩn *Salmonella* đặc biệt là vai trò của từng serotyp trong hội chứng tiêu chảy của lợn nuôi trong các trang trại lớn có sự kiểm soát chặt chẽ về vệ sinh thức ăn và nước uống. Nghiên cứu này đã phân lập và xác định các đặc tính sinh hóa, một số yếu tố độc lực, khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn *Salmonella* phân lập từ lợn con sau cai sữa mắc tiêu chảy tại các trang trại nuôi theo quy mô công nghiệp ở miền Bắc, xác định serotyp các chủng phân lập được và đưa ra nhận xét ban đầu về tỷ lệ các serotyp của *Salmonella* nhiễm trên lợn con sau cai sữa mắc tiêu chảy tại các trang trại nghiên cứu.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu và bệnh phẩm

Mẫu phân và mẫu bệnh phẩm (amidan, gan, lách, hạch màng treo ruột, chất chứa trong ruột non) của lợn sau cai sữa bị tiêu chảy nặng hoặc chết do tiêu chảy nặng từ 9 trang trại tại 6 tỉnh Ninh Bình, Hà Nội, Hòa Bình, Thái Nguyên, Phú Thọ, Vĩnh Phúc. Các trang trại lấy mẫu đều thuộc của các công ty chăn nuôi có quy mô đàn lớn (riêng đàn nái có từ 500 con), kiểu chuồng kín có hệ thống quạt thông khí và điều hòa nhiệt độ, sử dụng thức ăn công nghiệp...

Lợn được lấy mẫu biểu hiện các triệu chứng chán ăn, mệt mỏi, tiêu chảy phân màu vàng, lẫn chất nhầy, có mùi thối đặc biệt. Lợn chết có các đốm màu đỏ hay tím bầm ở da bụng, quanh tai và bẹn. Mẫu phân được lấy bằng cách dùng tăm bông vô trùng ngoáy vào trực tràng, cho vào các ống vô trùng. Mẫu nội tạng được đựng riêng trong từng túi nilon chuyên dùng. Các loại mẫu được bảo quản ở 4°C và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 8 giờ. Các mẫu phân lấy từ 19 lợn bị tiêu chảy. Số bệnh phẩm từ cơ quan nội tạng là 60 được lấy từ 22 lợn chết do tiêu chảy.

### 2.2. Vật liệu

Các loại môi trường dùng cho nuôi cấy, phân lập và giám định các đặc tính của vi khuẩn *Salmonella*. Hóa chất gồm Glucose, Mantol, Lactoze, Sorbitol, Dextrose, Sucrose, Galactose, Mannitol, Arabinose; thuốc nhuộm, dung dịch Kovac và Andrader được pha theo công thức hướng dẫn của các hãng Eiken Chemical Co. Ltd (Nhật), Oxoid Chemical Co. Ltd (Anh), Biorad (Mỹ), Merk (Đức). Giấy tẩm kháng sinh của Oxoid (Anh).

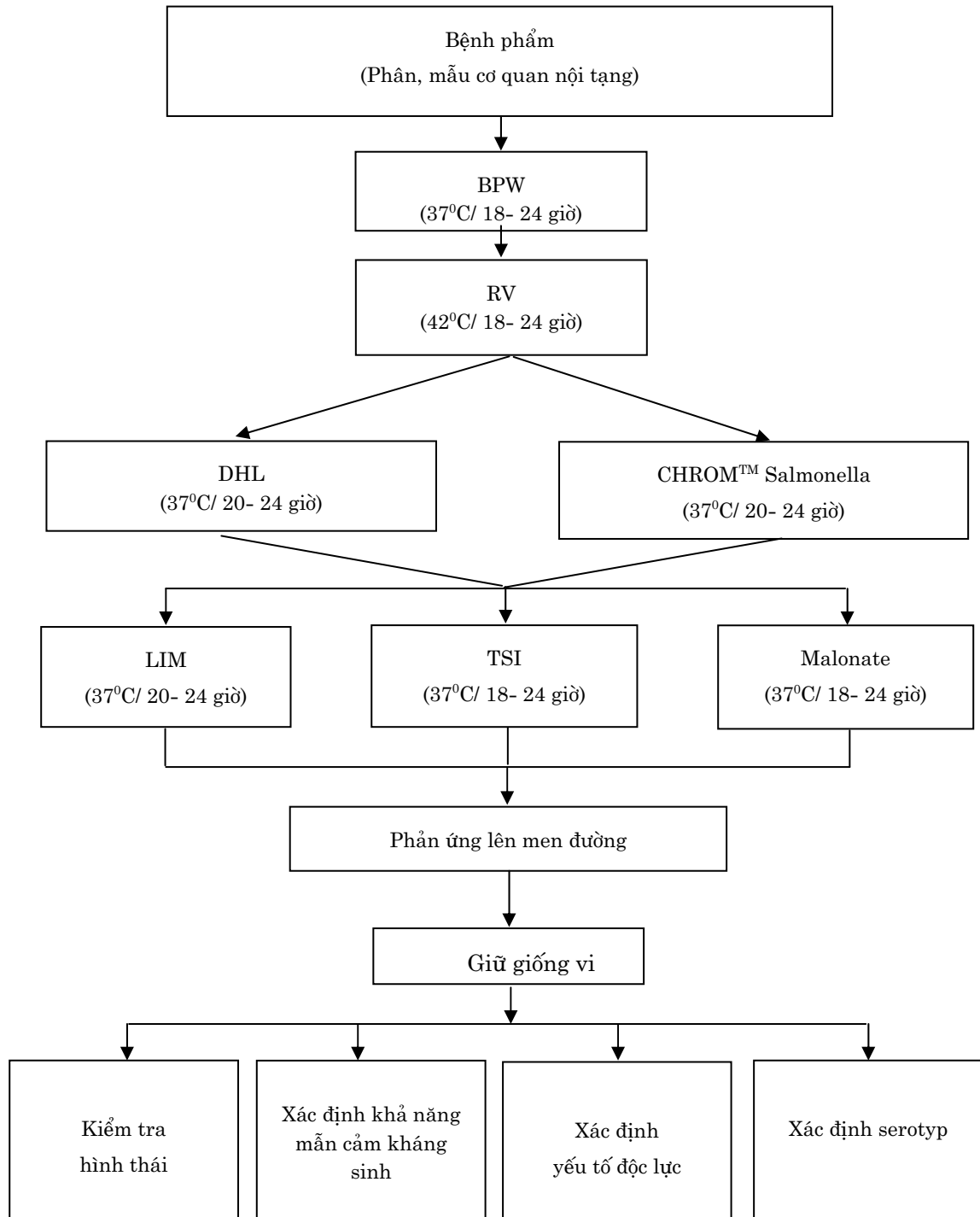
Kháng huyết thanh chuẩn do hãng Denka Seiken (Nhật Bản) sản xuất dùng để xác định kháng nguyên O và H.

Các nguyên liệu cho phản ứng PCR gồm Taq-DNA polymerase, dNTPs, đệm phản ứng, đệm điện di TAE (Tris-Acetic-EDTA), Gel loading buffer, Ethidium Bromide.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Nuôi cấy, phân lập vi khuẩn

***Salmonella***: Dựa trên quy trình phân lập và giám định vi khuẩn của Khoa Thú y ứng dụng và sức khỏe cộng đồng, trường Đại học Nông nghiệp và Thú y Obihiro, Nhật Bản (Hình 1).



**Hình 1. Quy trình phân lập và giám định vi khuẩn *Salmonella***

Ghi chú: BPW, Buffered Peptone Water; RV, Rappaport-Vassiliadis; DHL, Deoxycholate Hydrogen sulfide Lactose; LIM, Lysine-Indole-Motility; TSI, Triple Sugar Iron

**Bảng 1. Tiêu chuẩn đánh giá mức độ mẫn cảm của vi khuẩn với một số loại kháng sinh**

TT	Loại kháng sinh	Hàm lượng ( $\mu\text{g}$ )	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)		
			Mẫn cảm cao	Mẫn cảm trung bình	Kháng thuốc
1	Amoxicillin	20	$\geq 18$	14 - 17	$\leq 13$
2	Ampicillin	10	$\geq 17$	14 - 16	$\leq 13$
3	Apramycin	15	$\geq 18$	15 - 17	$\leq 14$
4	Colistin	10	$\geq 15$	13 - 14	$\leq 12$
5	Enrofloxacin	30	$\geq 17$	13 - 16	$\leq 12$
6	Gentamycin	10	$\geq 15$	13 - 14	$\leq 12$
7	Kanamycin	30	$\geq 18$	14 - 17	$\leq 13$
8	Norfloxacin	10	$\geq 17$	13 - 16	$\leq 12$
9	Streptomycin	10	$\geq 15$	12 - 14	$\leq 11$
10	Tetracycline	30	$\geq 15$	12 - 14	$\leq 11$
11	Sulfatrimethoprim	25	$\geq 16$	11 - 15	$\leq 10$

### 2.3.2. Xác định serotyp hai loại kháng nguyên O và H:

Dùng các phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh chuẩn (hãng Denka, Seiken Co., Ltd. Niigata, Japan); định danh vi khuẩn căn cứ vào bảng phân loại Kauffmann -White (Popoff, 2001). Với kháng nguyên H, lần lượt xác định kháng nguyên H pha 1 sau đó xác định kháng nguyên H pha 2.

Các chỉ tiêu kiểm tra bao gồm hình thái học, khả năng di động trong môi trường thạch bán cố thể; chuyển hóa các loại đường; phản ứng sinh Indol; phản ứng sinh  $\text{H}_2\text{S}$ ; phản ứng oxidaza; phản ứng catalaza, phản ứng lên men các loại đường.

Phương pháp xác định tính mẫn cảm với kháng sinh: Sử dụng phương pháp của Kirby- Bauer đánh giá tính mẫn cảm của vi khuẩn với các loại kháng sinh dựa vào bảng đánh giá kết quả của Viện tiêu chuẩn lâm sàng và phòng thí nghiệm (CLSI; trước đây là Hội đồng quốc gia tiêu chuẩn lâm sàng phòng thí nghiệm; NCCLS, 2007) (bảng 1). Các loại kháng sinh dùng trong nghiên cứu bao gồm amoxicillin, ampicillin, apramycin, colistin, enrofloxacin, gentamicin, kanamycin, norfloxacin, streptomycin, tetracycline và sulfatrimethoprim.

### Xác định sự có mặt của gen mã hóa độc tố đường ruột và yếu tố xâm nhập.

Gen mã hóa độc tố đường ruột (stn) và yếu tố xâm nhập (invA) của các chủng *Salmonella* được xác định bằng phản ứng PCR với các bước tiến hành và trình tự các cặp mồi theo các nghiên cứu đã được công bố (Cloekaert và cs., 2006; Skyberg và cs., 2006). Cặp mồi xác định sự có mặt của gen quy định độc tố Stn gồm mồi xuôi (Stn-F) có trình tự 5'- CTT TGG TCG TAA AAT AAG GCG- 3' và mồi ngược (Stn-R), 5'- TGC CCA AAG CAG AGA GAT TC- 3' cho sản phẩm PCR kích thước 259bp. Cặp mồi xác định sự có mặt của yếu tố xâm nhập gồm mồi xuôi (invA- F) có trình tự 5'- TTG TTA CGG CTA TTT TGA CCA- 3' và mồi ngược (invA- R) với trình tự 5'- CTG ACT GCT ACC TTG CTG ATG- 3' cho sản phẩm có kích thước 521bp. Chu trình nhiệt của PCR gồm giai đoạn biến tính ở 94°C trong 5 phút kế tiếp là 30 chu trình nhiệt (94°C trong 1 phút, 50°C trong 1 phút và 72°C trong 1 phút). Quá trình khuếch đại được kết thúc ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được nhuộm với chất nhuộm mầu (loading dye) theo tỉ lệ 1:5. Sau đó chạy điện di trên Gel Agarose 2% trong dung dịch đệm TAE với hiệu điện thế 100V

trong 30 phút. Gel sau khi chạy điện di được nhuộm bằng Ethidium Bromide (1 µl/ml) trong 15 phút; chụp ảnh với hệ thống Gel Doc 2000 dưới đèn UV (300 nm). Kích thước các đoạn ADN được so với ADN chuẩn (DNA marker).

Kiểm tra độc lực các chủng *Salmonella* phân lập được bằng phương pháp tiêm truyền động vật thí nghiệm:

Vi khuẩn từ môi trường giữ giống được cấy truyền vào môi trường BHI trong bình tam giác 100ml. Canh trùng được nuôi ở 37°C/24 giờ (có rung lắc để kích thích sự tăng sinh của vi khuẩn). Tiêm mỗi chủng vi khuẩn kiểm tra vào xoang phúc mạc 2 chuột nhất trắng có khối lượng 18-20g/con (liều tiêm 0,2ml canh trùng/con). Lô đối chứng gồm 2 chuột được tiêm 0,2ml dung dịch BHI/con. Chuột được theo dõi trong vòng 7 ngày sau khi tiêm. Các chỉ tiêu kiểm tra bao gồm trạng thái chuột thí nghiệm, thời gian chết sau khi tiêm. Căn cứ vào số lượng chuột chết, thời gian chết trung bình của mỗi lô để đánh giá độc lực của vi khuẩn. Mổ khám chuột chết và nuôi cấy phân lập vi khuẩn từ máu tim.

Số liệu được tính toán bằng Excel 2003. Sai khác có ý nghĩa được kiểm định bằng hàm Khi bình phương ( $\chi^2$ ).

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Salmonella* từ bệnh phẩm của lợn bị tiêu chảy

Kết quả phân lập vi khuẩn *Salmonella* từ 79 mẫu (bảng 2) cho thấy 100% mẫu phân lợn tiêu chảy phân lập được vi khuẩn *Salmonella*. Trong số các loại mẫu bệnh phẩm từ cơ quan nội tạng, tỷ lệ phân lập cao nhất ở hạch màng treo ruột và hồi tràng (83,33%) sau đó là ở hạch amidan (66,67%), thấp nhất từ các mẫu lách và gan (50%). Theo Wilcock và Schwatz (1992), chỉ 2 giờ sau khi gây nhiễm, *Salmonella* đã có mặt ở hạch lympho màng treo ruột. Nếu gây nhiễm theo đường miệng, 24 giờ sau vi khuẩn cũng đã xuất hiện ở hạch lympho màng treo ruột và hạch amidan. Đỗ Trung Cứ và cs. (2001) đã tìm thấy vi khuẩn *Salmonella* ở 9/9 loại phủ tạng gồm chất chứa ruột non, ruột già, hạch lympho màng treo ruột, hạch amidan, gan, lách, thận, máu tim, phổi của lợn từ 2 - 4 tháng tuổi bị tiêu chảy trong đó tỷ lệ cao nhất là hạch lympho màng treo ruột (94,59%), ở gan (91,89%) và thấp nhất là ở thận (27,08%). Tỷ lệ phân lập *Salmonella* từ các mẫu bệnh phẩm trong nghiên cứu này phù hợp với quy luật phân bố vi khuẩn này trong các cơ quan nội tạng của lợn bị tiêu chảy do *Salmonella*.

**Bảng 2. Kết quả phân lập *Salmonella* spp. từ phân và nội tạng lợn tiêu chảy**

STT	Bệnh phẩm	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
1	Mẫu phân	19	19	100,00 <sup>a</sup>
1	Hạch amidan	12	8	66,67 <sup>b</sup>
2	Gan	12	6	50,00 <sup>c</sup>
3	Lách	12	6	50,00 <sup>c</sup>
4	Hạch màng treo ruột	12	10	83,33 <sup>d</sup>
5	Chất chứa hồi tràng	12	10	83,33 <sup>d</sup>

Ghi chú: <sup>a, b, c, d</sup> chỉ giá trị khác nhau có ý nghĩa thống kê (P<0,05)

### 3.2. Kết quả giám định một số đặc tính nuôi cấy và sinh hóa của các chủng *Salmonella* phân lập được

Tất cả các chủng phân lập từ các mẫu phân (19 chủng) và 12 chủng phân lập từ cơ quan nội tạng (chọn ngẫu nhiên từ 40 chủng phân lập) được xác định một số đặc tính sinh hóa. Kết quả cho thấy 100% số chủng bắt màu gram âm với các đặc điểm hình thái điển hình của vi khuẩn *Salmonella*. Trong các môi trường tăng sinh BPW và RV, tất cả các chủng vi khuẩn đều mọc tốt, có khả năng di động, làm đục môi trường, có cặn dưới đáy ống nghiệm sau 24 giờ, tạo màng mỏng trên bề mặt môi trường nuôi cấy. Các chủng vi khuẩn khi nuôi cấy trên môi trường thạch DHL tạo khuẩn lạc ở giữa màu đen, xung quanh trong suốt hoặc khuẩn lạc trong suốt không màu. Trên môi trường thạch CHROM<sup>TM</sup> *Salmonella*, khuẩn lạc có màu tím hồng, dạng S. Tất cả 31 chủng *Salmonella* đều mọc và phát triển tốt trên môi trường TSI, có hoặc không sản sinh H<sub>2</sub>S, không làm chuyển màu môi trường LIM và không làm chuyển màu môi trường Malonate.

Sau khi xác định đặc tính nuôi cấy của các chủng vi khuẩn *Salmonella*, các đặc điểm sinh hóa đã được kiểm tra. Kết quả cho thấy

31 chủng kiểm tra đều lên men sinh hơi các đường glucose, mantol, sorbitol, dextrose, galactose, manitol, arabinose...nhưng không lên men đường lactose, sucrose. Tất cả các chủng *Salmonella* phân lập được đều không sản sinh Indol, phản ứng oxidaza âm tính, catalaze dương tính, 100% số chủng có khả năng di động, 74,09% các chủng sinh H<sub>2</sub>S.

Như vậy, đặc tính sinh vật hoá học của các chủng *Salmonella* phân lập được mang đặc điểm chung của giống *Salmonella* và phù hợp với những đặc điểm về hình thái, nuôi cấy, đặc tính sinh hoá của vi khuẩn này theo như mô tả của Cù Hữu Phú và cs. (2000), Đỗ Trung Cứ và cs. (2001), Quinn và cs. (2002)

### 3.3. Kết quả xác định serotyp của các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập được

Serotyp của các chủng *Salmonella* phân lập được bằng các phản ứng ngưng kết trên phiến kính và trong ống nghiệm sử dụng kháng huyết thanh chuẩn (do Denka Seiken Co., Ltd. Tokyo, Nhật Bản cung cấp) đối với kháng nguyên thân O và kháng nguyên lông H của vi khuẩn *Salmonella* 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* phân lập**

Số chủng kiểm tra	Công thức kháng nguyên			Kết quả		Kết luận về serotyp
	KN O	KN H		Số chủng dương tính	Tỷ lệ dương tính (%)	
		Pha 1	Pha 2			
n=31	4	i	1,6	5	16,14 <sup>a</sup>	S.agona
	3,10	e,h	L,w	2	6,45 <sup>b</sup>	S.meleagridis
	3,10	1	z6	2	6,45	S.ruzizi
	4	i	1,2	16	51,61 <sup>c</sup>	S.typhimurium
	3,10	e,h	1,6	6	19,35	S.anatum

Ghi chú: <sup>a, b, c</sup> giá trị khác nhau có ý nghĩa thống kê

Sự có mặt của các thành phần kháng nguyên O và kháng nguyên H là căn cứ để xác định serotyp của vi khuẩn *Salmonella*. Kết quả ở bảng 3 cho thấy, 16 trong 31 chủng vi khuẩn *Salmonella* được xác định là *S. typhimurium* (chiếm 51,61%); 6 chủng là *S. anatum* (chiếm 19,35%); 5 chủng là *S. agona* (16,14%); 2 chủng là *S. meleagridis* (6,45%) và 2 chủng là *S. ruzizi* (chiếm 6,45%). Như vậy, *S. typhimurium* chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp đến là *S. anatum* và *S. agona*. Nghiên cứu của Laval (2000) cho thấy *S. choleraesuis* là tác nhân gây bệnh thể cấp tính và được tìm thấy với tỷ lệ cao nhất. Theo Lê Văn Tạo và Nguyễn Thị Vui (1994), *Salmonella* ở lợn chủ yếu là *S. choleraesuis*. Phân lập từ 75 mẫu phân ở một số vùng thuộc Ba Vì (Hà Tây cũ), Tạ Thị Vinh và Đặng Khánh Vân (1996) cũng cho biết *S. choleraesuis* chiếm tỷ lệ cao nhất (60%) trong khi Trịnh Tuấn Anh và cs.(2010) phát hiện *S. enteritidis* có tỷ lệ cao nhất trong các chủng *Salmonella* phân lập được. Tuy nhiên, trong số chủng chúng tôi phân lập ở nghiên

cứu này không tìm thấy *S. choleraesuis* trong khi *S. typhimurium* chiếm tỷ lệ cao. Theo thông tin từ Trung tâm phòng chống dịch bệnh Mỹ (CDC) công bố năm 2006, *S. typhimurium* là serotyp *Salmonella* phổ biến nhất ở lợn tiêu chảy. Một thông tin thú vị hơn, theo Foley và cs. (2008), cũng tại Mỹ, trong những năm gần đây, *S. typhimurium* đã thay thế *S. choleraesuis* để trở thành serotyp gây bệnh phổ biến nhất trên lợn. Như vậy có thể tỷ lệ lưu hành các serotyp của vi khuẩn *Salmonella* trên lợn (hay ít nhất là trên đàn lợn sau cai sữa nuôi công nghiệp) ở miền Bắc có thể đã có sự thay đổi. Tuy nhiên với lượng mẫu/chủng phân lập trong nghiên cứu còn hạn chế nên cần có những nghiên cứu tiếp theo để khẳng định.

### 3.4. Kết quả kiểm tra mức độ mẫn cảm của các chủng *Salmonella* phân lập được với một số loại kháng sinh

Mức độ mẫn cảm với 11 loại kháng sinh của 31 chủng được kiểm theo phương pháp của Kirby- Bauer (1996) (bảng 4).

**Bảng 4. Kết quả kiểm tra mức độ mẫn cảm với một số loại kháng sinh của các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập được**

TT	Loại kháng sinh	Số chủng kiểm tra	Mẫn cảm		Kháng	
			Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
1	Amoxicillin	31	1	3,23	30	96,77 <sup>a</sup>
2	Ampicillin	31	1	3,23	30	96,77 <sup>a</sup>
3	Apramycin	31	18	58,06	13	41,94 <sup>d</sup>
4	Colistin	31	15	48,39	16	51,61 <sup>d</sup>
5	Enrofloxacin	31	4	12,90	27	87,10 <sup>b</sup>
6	Gentamicin	31	11	35,48	20	64,52 <sup>d</sup>
7	Kanamycin	31	9	29,03	22	70,97 <sup>c</sup>
8	Norfloxacin	31	16	51,61	15	48,39 <sup>d</sup>
9	Streptomycin	31	0	0,00	31	100,00 <sup>a</sup>
10	Sulfatrimethoprim	31	2	6,45	29	93,55 <sup>a</sup>
11	Tetracyclin	31	1	3,23	30	96,77 <sup>a</sup>

Ghi chú: <sup>a, b, c, d</sup> chỉ giá trị khác nhau có ý nghĩa thống kê (P<0,05)

Như vậy tất cả các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập được kháng với streptomycin. Đa số các chủng kháng tetracyclin, amoxicillin và ampicillin là (96,77%) và sulfatrimethoprim (93,55%). Số chủng mẫn cảm với apramycin chiếm tỷ lệ cao nhất (58,06%) tiếp theo là với norfloxacin (51,61%) và colistin (48,39%). Theo Phùng Quốc Chương (1995), vi khuẩn *Salmonella* mẫn cảm nhất với norfloxacin và ciprofloxacin. Kết quả nghiên cứu của Tô Liên Thu (2005) cho biết *Salmonella* phân lập được từ thịt lợn mẫn cảm cao với norfloxacin (90%), ofloxacin (90%) và gentamicin (90%). Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, nếu không xét riêng từng chủng vi khuẩn, đã có sự thay đổi về tỷ lệ các chủng *Salmonella* mẫn cảm với các loại kháng sinh (tỷ lệ mẫn cảm giảm so với các nghiên cứu đã được công bố). Có thể nhận xét rằng tác dụng của nhiều loại kháng sinh đối với vi khuẩn *Salmonella* đã giảm.

### 3.5. Kết quả kiểm tra độc lực các chủng *Salmonella* phân lập được

Trong số 5 serotyp được phát hiện, mỗi serotyp chúng tôi chọn ngẫu nhiên 2 chủng để kiểm tra độc lực bằng phương pháp tiêm truyền qua chuột nhắt trắng (2ml canh trùng /chuột; tiêm phúc mạc); 2 chuột đối chứng (2ml môi trường BHI /chuột; tiêm phúc mạc). Kết quả theo dõi (bảng 5) các chủng nghiên cứu gây chết 100% chuột thí nghiệm. Thời gian gây chết chuột thí nghiệm sớm nhất là 8 giờ sau tiêm (đối với *S. typhimurium*) và gây chết muộn nhất ở 26 giờ sau tiêm (đối với *S.ruzizi*). Tất cả các mẫu máu từ chuột chết đều phân lập được vi khuẩn *Salmonella*. Các chủng *Salmonella* phân lập được đều thể hiện độc lực cao chứng tỏ vi khuẩn *Salmonella* là một nguyên nhân quan trọng gây tiêu chảy trên các đàn lợn tại các trang trại thuộc nghiên cứu này.

**Bảng 5. Kết quả kiểm tra độc lực các chủng *Salmonella* phân lập được bằng phương pháp tiêm truyền qua chuột nhắt trắng**

Serotyp	Liều tiêm (ml)	Đường tiêm	Số chuột thử	Kết quả theo dõi				Kết quả phân lập vi khuẩn
				Thời gian chuột chết sớm nhất	Thời gian chuột chết muộn nhất	Số con chết	Tỷ lệ (%)	
<i>S.agona</i>	0,2	Phúc mạc	4	13	17	4	100	+
<i>S.meleagridis</i>	0,2	Phúc mạc	4	15	20	4	100	+
<i>S.ruzizi</i>	0,2	Phúc mạc	4	16	20	4	100	+
<i>S.typhimurium</i>	0,2	Phúc mạc	4	8	12	4	100	+
<i>S.anatum</i>	0,2	Phúc mạc	4	10	14	4	100	+
Đối chứng (BHI)	0,2	Phúc mạc	2	0	0	0	0,00	

**Bảng 6. Kết quả xác định các gen mã hóa một số yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập được**

TT	Serotyp	Số chủng kiểm tra	Yếu tố gây bệnh			
			Stn		InvA	
			(+)	(%)	(+)	(%)
1	<i>S.agona</i>	5	4	80,00	5	100,00
2	<i>S.meleagridis</i>	2	1	50,00	2	100,00
3	<i>S.ruzizi</i>	2	1	50,00	1	50,00
4	<i>S.typhimurium</i>	16	16	100,00	16	100,00
5	<i>S.anatum</i>	6	5	83,33	6	100,00
	Tổng/ trung bình	31*	27*	87,10 <sup>#</sup>	30*	96,77 <sup>#</sup>

Ghi chú: \* tổng số, # giá trị trung bình



### 3.6. Kết quả xác định các gen mã hóa một số yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập được

Gen quy định độc tố (*Salmonella* toxin; *stn*) và yếu tố xâm nhập (Invasion A; *invA*) được xác định bằng phương pháp PCR (bảng 6).

Tất cả các chủng thuộc serotyp *S. typhimurium* được kiểm tra có mang cả hai gen *stn* và *invA*. Tất cả 6 chủng *S.anatum* mang gen *invA* trong đó 5 chủng mang gen *stn* (83,33%). Trong số 5 chủng thuộc serotyp *S.agona*, 4 chủng mang gen *stn* (chiếm 80%) nhưng tất cả các chủng mang gen *invA*. Cả hai chủng *S.meleagridis* mang gen *invA* trong đó 1 chủng mang gen *stn*. Trong số 2 chủng *S.ruzizi* được kiểm tra thì 1 chủng mang gen *stn* và 1 chủng có gen *invA*. Như vậy, hầu hết các chủng *Salmonella* mang gen mã hóa yếu tố xâm nhập (tỷ lệ chung mang gen này tới 96,77%, chỉ có một chủng thuộc serotyp *S.ruzizi* không mang gen này) và tỷ lệ cao các chủng mang gen quy định độc tố đường ruột (87,10%). Các chủng thuộc serotyp *S. typhimurium* đều mang cả hai gen quy định độc tố. Tỷ lệ các chủng mang gen quy định độc tố cao ở serotyp *S.anatum* và *S.agona*. Đối với *S.meleagridis* và *S.ruzizi*, có thể do số chủng nghiên cứu chưa còn ít (2 chủng) nên chưa đủ để kết luận về tỷ lệ mang các yếu tố độc lực và yếu tố xâm nhập. Kết quả xác định gen quy định yếu tố xâm nhập và gen quy định độc tố cho thấy khả năng gây bệnh cao của *Salmonella* tại các trại. Đặc biệt với *S.typhimurium*, serotyp vừa có tỷ lệ phát hiện cao trong các mẫu nghiên cứu vừa có tỷ lệ mang yếu tố độc lực và yếu tố xâm nhập cao

## 4. KẾT LUẬN

Các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập được từ lợn sau cai sữa bị tiêu chảy với

các triệu chứng điển hình do vi khuẩn *Salmonella* tại các trang trại chăn nuôi lợn quy mô công nghiệp ở miền Bắc mang đầy đủ các đặc tính sinh vật, hóa học điển hình. Mặc dù số lượng mẫu còn hạn chế nhưng đây là nghiên cứu đầu tiên cho thấy *S.typhimurium* chiếm tỷ lệ cao nhất trong các serotyp phân lập được. Các chủng vi khuẩn phân lập được đều có độc lực cao khi tiêm truyền động vật thí nghiệm.

Chủng thuộc các serotyp mang gen quy định độc tố và yếu tố xâm nhập với tỷ lệ cao. Đặc biệt 100% số chủng *S.typhimurium* được phát hiện mang cả hai gen quy định độc tố và yếu tố xâm nhập. Cùng với tỷ lệ phát hiện cao, có thể cho rằng cần chú ý vai trò của *S.typhimurium* trong chăn nuôi lợn hiện nay. Nghiên cứu cũng cho thấy khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn *Salmonella* có chiều hướng tăng.

Những nghiên cứu phân tích dịch tễ học để khẳng định sự thay đổi về tỷ lệ lưu hành các serotyp cùng với việc xác định yếu tố bám dính, độc tố thẩm xuất và đặc biệt là gen kháng kháng sinh... là những nội cần được đặt ra trong các nghiên cứu tiếp theo làm cơ sở cho nghiên cứu và sản xuất vaccin phòng và các biện pháp điều trị bệnh do *Salmonella* trên lợn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Trịnh Tuấn Anh, Cù Hữu Phú, Văn Thị Hương, Nguyễn Văn Sửu (2010). Tình hình tiêu chảy ở lợn con và kết quả phân lập vi khuẩn *Salmonella* tại một số địa phương tỉnh Thái Nguyên. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y Tập XVII Số 4, 41-48.
- Phùng Quốc Chương (1995). Tình hình nhiễm *Salmonella* ở lợn tại vùng Tây Nguyên và khả năng phòng trị. Luận án PTS khoa học nông nghiệp. Trường Đại học Nông nghiệp I Hà Nội.
- CLSI (formerly NCCLS) (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 17<sup>th</sup> Informational Supplement 27(1).

- CloECKaert A, Praud K, Doublet B, Demartin M and Weill F.X (2006). Variant *Salmonella* genomic island J - L antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar. Newport". Antimicrob. Agents Chemother 50, 3944-3946.
- Đỗ Trung Cứ, Trần Thị Hạnh, Nguyễn Quang Tuyên (2001). Kết quả phân lập và xác định một số yếu tố gây bệnh của vi khuẩn *Salmonella* spp gây bệnh phó thương hàn lợn ở một số tỉnh miền núi phía Bắc. Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y, số 3, tr. 10-17.
- EMA (European Medical Agency). Reflection paper on the use of fluoroquinolones in food-producing animals in the European Union: Development of resistance and impact on human and animal health. Truy cập tại <http://www.fidm.nl/54601/EMA-CVMP-reflection-paper-fluoroquinolones-food-producing-animals-EU-20060501.pdf>, ngày 9 tháng 1 năm 2012
- Foley S.L., Lynne A.M., and Nayak R. (2008). *Salmonella* challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. Journal of Animal Science 86 (E.Suppl.) E149-E162
- Nguyễn Bá Hiên (2001). Một số vi khuẩn đường ruột thường gặp và biến động của chúng ở gia súc khỏe mạnh và bị tiêu chảy nuôi tại vùng ngoại thành Hà Nội. Luận án Tiến sỹ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.
- Laval A (2000) (Tài liệu dịch của Trần Thị Hạnh). Dịch tễ Salmonellosis. Báo cáo tại hội thảo về bệnh lợn tại Viện Thú y - Hà Nội tháng 6/2000.
- Cù Hữu Phú, Nguyễn Ngọc Nhiên, Vũ Bình Minh, Đỗ Ngọc Thuý (2000). Phân lập vi khuẩn *E.coli* và *Salmonella* ở lợn mắc bệnh tiêu chảy, xác định một số đặc tính sinh vật hoá học của các chủng vi khuẩn phân lập được và biện pháp phòng trị. Kết quả nghiên cứu Khoa học kỹ thuật thú y (1996-2000), NXB Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 171-176.
- Popoff M.Y (2001). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8<sup>th</sup> edition. WHO Collaborating Centre for reference and Research on *Salmonella* Pasteur Institute, Paris, France, p. 156.
- Trương Quang (2004). Kết quả nghiên cứu tình trạng loạn khuẩn đường ruột, các yếu tố gây bệnh của *Salmonella* trong hội chứng tiêu chảy của lợn 3 tháng tuổi và lợn nái. Tạp chí KHKT Nông nghiệp, tập II, số 42, 255-260
- Trương Quang, Trương Hà Thái (2007). Biến động của một số vi khuẩn đường ruột và vai trò của *Salmonella* trong hội chứng tiêu chảy của lợn 2-4 tháng tuổi. Tạp chí KHKT Thú y, tập XIV, số 6, 52-57
- Quinn P.J, Carter M.E, Makey B, Carter G.R (2002). Clinical veterinary microbiology. Wolfe Publishing, London WC1 H9LB, England, 209-236.
- Skyberg J.A, Logue C.M and Nolan L.K (2006). Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. Avian Diseases. 50, p. 77-81.
- Lê Văn Tạo, Nguyễn Thị Vui (1994). Phân lập và định typ vi khuẩn *Salmonella* gây bệnh cho lợn.. Tạp chí Nông nghiệp và công nghiệp thực phẩm. 11, 430-431.
- Tô Liên Thu (2005). Nghiên cứu tình trạng ô nhiễm một số vi khuẩn vào thịt lợn, thịt gà sau giết mổ ở Hà Nội và một số phương pháp làm giảm sự nhiễm khuẩn trên thịt. Luận án Tiến sỹ Nông nghiệp, Viện Thú y Quốc gia Hà Nội.
- Tạ Thị Vịnh, Đặng Khánh Vân (1996). Bước đầu thăm dò và xác định *E.coli* và *Salmonella* trên lợn bình thường và lợn mắc hội chứng tiêu chảy tại Hà Tây và Hà Nội. Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y, số I, 41- 44.
- Wilcock B.P, Schwartz K.J (1992). *Salmonella* Disease of Swine 7<sup>th</sup> Edition, 570-583.