

**VAI TRÒ CỦA *Escherichia coli* VÀ *Salmonella* spp.
TRONG HỘI CHỨNG TIÊU CHẢY Ở LỢN CON TRƯỚC VÀ SAU CAI SỮA:
NGHIÊN CỨU TRÊN MÔ HÌNH TRẠI NUÔI CÔNG NGHIỆP**

Nguyễn Anh Tuấn^{1,2}, Nguyễn Bá Tiếp^{1*}

¹*Khoa Thú y, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội;*

²*Học viên cao học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

Email: nbtiep@hua.edu.vn

Ngày gửi bài: 17.04.2013

Ngày chấp nhận: 19.06.2013

TÓM TẮT

Vai trò của *E.coli* và *Salmonella* spp. trong hội chứng tiêu chảy (HCTC) của lợn con nuôi công nghiệp được xác định trên đàn lợn tại công ty Sơn Trà tỉnh Bắc Ninh. Tỷ lệ phân lập *E.coli* từ mẫu phân của lợn con theo mẹ là 86,2%; từ mẫu phân lợn sau cai sữa là 78,0%. Trong các chủng phân lập từ lợn con theo mẹ, tỷ lệ các serotyp O149, O101, O64 và O8 lần lượt là 48; 20; 12 và 8%. Tỷ lệ các serotyp thuộc các chủng phân lập từ lợn con sau cai sữa là O141 (43,7%), O139 (28,1%), O149 và O138 cùng chiếm 9,3%. Tỷ lệ các chủng *E.coli* phân lập từ lợn con theo mẹ mang gen mã hóa độc tố STa, STb, LT và các yếu tố bám dính F4, F18 là 32; 44; 24; 44 và 32%. Ở nhóm chủng từ lợn con sau cai sữa, tỷ lệ tương ứng là 65,5; 21,8; 59,4; 0 và 34,3%. Chỉ phân lập được *Salmonella* từ phân của lợn con sau cai sữa mắc HCTC với tỷ lệ thấp so với các nghiên cứu đã được công bố; tất cả các chủng phân lập đều được xác định là *S. typhimurium* và có độc lực cao trên chuột thí nghiệm. Các chủng *E.coli*, *Salmonella* phân lập được mẫn cảm cao với Apramycin, Cephalothin, Amikacin, Certiofur và kháng Tetramycin. Có thể bước đầu nhận xét rằng trong điều kiện nuôi công nghiệp, vi khuẩn *E. Coli* đóng vai trò trội trong HCTC ở lợn con, đặc biệt là lợn con theo mẹ trong khi đó ở lợn con sau cai sữa cần phải chú ý đến vai trò của *Salmonella* spp.

Từ khóa: *E.coli*, lợn con, *Salmonella* spp., tiêu chảy, trại nuôi công nghiệp.

**Roles of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in Diarrhoea in
Pre- and Post-Weaning Piglets: A Research in An Industrial Farm Model**

ABSTRACT

The role of *Escherichia coli* (*E.coli*) and *Salmonella* spp. to diarrhoea of pre- and post-weaning piglets was investigated in Son Tra industrial farm in Bac Ninh province. The isolation rates for *E.coli* from fecal samples of pre- and post-weaning diarrheic piglets were 86.2 and 78%, respectively. Serotype O149 comprised the highest percentage (48%) followed by O101 (20%); O64 (12%) and O8 (8%) in isolates from pre-weaning piglets. Among isolates from post-weaning piglets, O141 comprised 43.7%, followed by O139 (28.1%), O149 and O138 (9.3% for each serotype). Genes encoding for STa, STb, LT, F4, and F18 were detected at 32, 44, 24, 44 and 32% in the isolates from pre-weaning piglets whereas, from fecal samples of post-weaning piglets, the detection rates were 65.5; 21.8; 59.4; 0 and 34.3%, respectively. The virulence was found higher for isolates from pre-weaning piglets. *Salmonella* spp. were detected only from fecal samples of post-weaning piglets with lower incidence in comparison to previous reports and all of the isolates were *S. typhimurium* with very high virulence. High susceptibility of both *E.coli* and *Salmonella* isolates to Apramycin, Cephalothin, Amikacin, and Certiofur was observed. Taken together, *E.coli* seemed to play a dominant role in diarrhoea of pre-weaning piglets in an industrial farm and that can be shared by *Salmonella* spp. in post-weaning counterparts.

Keywords: Diarrhoea, *E.coli*, industrial farm, piglets, *Salmonella* spp.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Với quy trình phòng bệnh chặt chẽ, hội chứng tiêu chảy (HCTC) trở thành yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến năng suất các trại chăn nuôi lợn quy mô công nghiệp. Bên cạnh đó, quy trình nuôi là yếu tố tác động đến sự tương tác giữa vật chủ và vi sinh vật gây bệnh trong đó có các vi khuẩn đường ruột (Foley và cs., 2008). Nghiên cứu trước đây cho thấy hiện tượng bội nhiễm *E.coli* cũng phụ thuộc vào tuổi lợn mắc HCTC, cao hơn ở lợn con theo mẹ so với ở lợn sau cai sữa (Trương Quang, 2005).

Tương tự vi khuẩn *E.coli*, một số tác giả chứng minh có sự khác nhau về tỷ lệ nhiễm *Salmonella* và độc lực của vi khuẩn này ở các lứa tuổi lợn cũng như ở lợn khỏe mạnh và lợn mắc HCTC (Trương Quang, 2004; Trương Quang và Trương Hà Thái, 2007). Các nghiên cứu trong những năm gần đây cho thấy có sự thay đổi về vai trò của các serotyp của *Salmonella* trong HCTC ở lợn tại Mỹ (Foley và cs., 2008) và có thể là ở Việt Nam (Nguyễn Mạnh Phương và cs., 2012). Nhiều tác giả cho rằng yếu tố giống và quy trình nuôi công nghiệp đã dẫn đến sự thay đổi này.

Nghiên cứu này được tiến hành trên đàn lợn nuôi tại trang trại chăn nuôi quy mô lớn với quy trình hiện đại đáp ứng các tiêu chuẩn của chăn nuôi công nghiệp (Nguyễn Mạnh Phương và cs., 2012) nhằm bước đầu đưa ra nhận xét về mối quan hệ giữa tuổi của lợn con mắc HCTC với tỷ lệ phân lập vi khuẩn *Salmonella* và *E.coli* cũng như các đặc điểm sinh học ảnh hưởng đến độc lực của các chủng vi khuẩn phân lập từ lợn mắc bệnh. Kết quả nghiên cứu nhằm góp phần xác định vai trò của vi khuẩn *Salmonella* và *E.coli* trong HCTC ở lợn con trước và sau cai sữa trong các trang trại chăn nuôi công nghiệp ở miền Bắc Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Các loại môi trường, hoá chất

Các loại môi trường dùng cho phân lập, nuôi cấy vi khuẩn đường ruột bao gồm: Thạch máu,

thạch MacConkey, thạch ISI, thạch DHL, thạch brilliant green, nước thịt BHI, nước thịt thường, nước thịt pepton, thạch simmons citrate.

Các hóa chất glucose, mantol, lactose, 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 tấm 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 của các chủng *Salmonella* phân lập.

Nguyên liệu cho phản ứng PCR gồm các primer Taq-DNA polymerase, dNTPs, đệm phản ứng, đệm điện di TAE (Tris-Acetic-EDTA), gel loading buffer, ethidium bromide.

Các hoá chất và dụng cụ phòng thí nghiệm khác dùng trong nghiên cứu vi khuẩn.

Động vật thí nghiệm: Chuột bạch khoẻ mạnh, có khối lượng cơ thể từ 18-20 g/con.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và giám định vi khuẩn *E.coli* và *Salmonella*

Mẫu phân lợn tiêu chảy được lấy từ trực tràng (bằng tăm bông vô trùng) của lợn con theo mẹ (đến 21 ngày tuổi) và lợn con sau cai sữa (đến 60 ngày tuổi) bị mắc tiêu chảy tại công ty Sơn Trà (Bắc Ninh).

Các phương pháp nuôi cấy và giám định vi khuẩn được thực hiện theo các bước: Mẫu phân của lợn tiêu chảy được ria cấy lên các môi trường thạch máu, thạch MacConkey và thạch DHL, bồi dưỡng ở tủ ấm 37°C trong 24 giờ. Sau 24 giờ nuôi cấy ở 37°C tiến hành quan sát khuẩn lạc, xác định loại vi khuẩn đường ruột. Những khuẩn lạc điển hình được phiết kính kiểm tra hình thái, giám định bằng các đặc tính sinh vật, hoá học. Sau thuần khiết, tiến hành xác định serotyp và giữ giống cho các bước kiểm tra tiếp theo.

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 H₂S; phản ứng oxidase; phản ứng catalase, phản ứng lên men các loại đường.

2.2.2. Xác định cấu trúc kháng nguyên của các chủng *E.coli* phân lập

Được thực hiện theo phương pháp ngưng kết nhanh trên phiến kính; các chủng vi khuẩn được tiến hành xác định nhóm với các huyết thanh đa giá sau đó đến các huyết thanh đơn giá trong nhóm.

2.2.3. Xác định cấu trúc kháng nguyên của các chủng *Salmonella* phân lập

Xác định serotyp hai loại kháng nguyên O và H: Dùng các phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh chuẩn; 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.

2.2.4. Xác định sự có mặt của gen mã hóa độc tố của các chủng vi khuẩn phân lập

Gen mã hóa độc tố chịu nhiệt (Heat Stable Enterotoxin-ST) gồm hai gen STa và STb và gen mã hóa độc tố không chịu nhiệt (Heat Labile Toxin – LT); gen quy định yếu tố bám dính F4 và F18 của các chủng *E.coli*; gen quy định yếu tố thẩm xuất nhanh (Rapid Permeability Factor – RPF) và yếu tố thẩm xuất chậm (Delayed Permeability Factor – DPF) của các chủng *Salmonella* phân lập được xác định bằng phản ứng PCR.

2.2.5. Phương pháp xác định tính miễn cảm với kháng sinh

Sử dụng phương pháp của Kirby- Bauer đánh giá tính miễn 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).

2.2.6. Kiểm tra độc lực các chủng vi khuẩn 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 bồi dưỡng 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 nhắt 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.

2.2.7. Phương pháp phân tích số liệu

Các kết quả thu được qua các thí nghiệm được xử lý với phần mềm Excel 2007. Sai khác có ý nghĩa được kiểm định bằng hàm χ^2 .

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn từ các mẫu phân lợn mắc hội chứng tiêu chảy

Kết quả kiểm tra vi khuẩn của 70 mẫu phân của lợn mắc tiêu chảy tại trại của công ty Sơn Trà được trình bày ở bảng 1.

Kết quả phân lập cho thấy mẫu phân từ các lợn tiêu chảy phân lập được vi khuẩn *E.coli* với

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn *E.coli* và *Salmonella*

Loại lợn	Số mẫu	Phân lập được <i>E.coli</i>		Phân lập được <i>Salmonella</i>	
		Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)
Lợn theo mẹ	29	25	86,2	0	0
Lợn sau cai sữa	41	32	78,0	3	7,3
Tính chung	70	57	81,4	3	4,2

tỷ lệ cao trong đó tỷ lệ mẫu dương tính với *E.coli* từ lợn con theo mẹ cao hơn ở lợn sau cai sữa ($P < 0,05$). Trong khi *Salmonella* chỉ có mặt ở 3 trong tổng số 70 mẫu. Đặc biệt, cả 3 mẫu phát hiện sự có mặt của vi khuẩn *Salmonella* đều của lợn sau cai sữa.

Như vậy, tỷ lệ phân lập được vi khuẩn *E.coli* cao hơn rất nhiều so với vi khuẩn *Salmonella*. Có thể do khi lợn nhiễm một chủng vi khuẩn *E.coli* gây bệnh thì các vi khuẩn này sẽ phát triển trong cơ thể lợn, tăng nhanh về số lượng và độc lực thậm chí có thể lấn át hoặc kìm hãm sự phát triển của các loại vi khuẩn khác. Nghiên cứu của Cù Hữu Phú và cs. (2004) đã xác định được tỷ lệ của vi khuẩn *E.coli* tới 79,75% trong tổng số lợn tiêu chảy; Lý Thị Liên Khai (2001) cũng phân lập được 42 mẫu phân có vi khuẩn *E.coli*, chiếm tỷ lệ 84% trong tổng số 50 mẫu phân lợn con bị tiêu chảy. Kết quả của chúng tôi tương tự với kết quả nghiên cứu của Cù Hữu Phú và cs. (1999) khi tiến hành phân lập vi khuẩn *E.coli* từ các mẫu phân của lợn từ 35 đến 4 tháng tuổi bị tiêu chảy, đã xác định được 60/70 mẫu có vi khuẩn có *E.coli*, chiếm tỷ lệ 85,71%. Trịnh Quang Tuyên và cs (2004) đã xác định được 259/325 mẫu phân lợn con mắc tiêu chảy có vi khuẩn *E.coli*, chiếm tỷ lệ 79,69%. Trong khi đó Nguyễn Thị Kim Lan (2004) và Trương Quang (2005) cho biết 100% mẫu phân lợn con mắc phù đầu tại Bắc Giang, Thái Nguyên và 100% mẫu phân lợn con mắc tiêu chảy tại Hà Nội phân lập được vi khuẩn *E.coli*.

Theo Nguyễn Thị Oanh (2003), tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở lợn mắc tiêu chảy tại Đắk Lắk là 23,68%. Nguyễn Thị Ngữ (2005) công bố 75-78,6% số mẫu phân lợn mắc tiêu chảy có *Salmonella*. Như vậy, tỷ lệ mẫu phân dương tính với *Salmonella* trong nghiên cứu này thấp hơn nhiều so với các kết quả trước đây.

Từ kết quả này có thể nhận xét rằng *E. coli* là nguyên nhân “trội” gây hội chứng tiêu chảy cho đàn lợn con tại trang trại nghiên cứu. Theo chúng tôi, cần có những nghiên cứu tiếp theo về ảnh hưởng của điều kiện chăn nuôi công nghiệp đến sự hiện diện của *Salmonella* và vai trò của vi khuẩn này trong hội chứng tiêu chảy ở lợn con.

3.2. Kết quả giám định đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được

Tất cả các chủng *Salmonella* kiểm tra đều cho các phản ứng MR, Citrat và TSI dương tính, còn các phản ứng Indol và VP âm tính. Các chủng đều lên men các loại đường arabinose, dextrose, galactose, glucose, maltose, mannitol và sorbitol. Riêng với đường lactose, đều cho kết quả âm tính (Bảng 2).

Căn cứ kết quả giám định đặc tính sinh hóa của 57 chủng vi khuẩn *E.coli* và 3 chủng *Salmonella* spp. phân lập được có thể thấy các chủng vi khuẩn phân lập được đều có đặc điểm chung, điển hình của vi khuẩn *E.coli* và *Salmonella* spp.

3.3. Kết quả xác định serotyp kháng nguyên O của các chủng vi khuẩn phân lập được

3.3.1. Kết quả xác định serotyp kháng nguyên O của các chủng *E.coli* phân lập được

Trong 25 chủng vi khuẩn *E.coli* phân lập từ lợn con theo mẹ, các serotyp kháng nguyên O chiếm tỷ lệ cao là O149 và O101. Trong số 32 chủng phân lập từ lợn con sau cai sữa, các serotyp kháng nguyên O chiếm tỷ lệ cao gồm O141 và O139. Như vậy có sự khác nhau về tỷ lệ các serotyp kháng nguyên O của các chủng *E.coli* phân lập giữa hai nhóm lợn con, O149 chiếm tỷ lệ cao ở nhóm chủng phân lập từ lợn con theo mẹ trong khi O141 có tỷ lệ phát hiện cao nhất ở nhóm chủng phân lập từ lợn con sau cai sữa (Bảng 3).

Theo Fairbrother (1992), các serotyp O138, O139, O141 và O149 thuộc nhóm vi khuẩn ETEC và VTEC là các nhóm thường hay gặp gây tiêu chảy cho lợn con sau cai sữa. Tác giả Vũ Khắc Hùng và cs. (2004) thấy rằng serotyp O149 chiếm tỷ lệ cao nhất (77%) trong tổng số 220 chủng vi khuẩn được kiểm tra. Tại đồng bằng sông Cửu Long, Nguyễn Khả Ngự (2000) xác định tỷ lệ O26 là 27,8%, tiếp đến là O139 (13,9%). Các serotyp O127, O111, O124, O125, O126, O86, O149 đều chiếm tỷ lệ 8,3%, còn serotyp O55, O128 chỉ chiếm tỷ lệ 2,8%. Tại Tiền Giang, Nguyễn Trung Trực và cs. (2004) xác định các serotype O8, O64, O142,

Vai trò của *Escherichia coli* và *Salmonella* spp. trong hội chứng tiêu chảy ở lợn con trước và sau cai sữa: Nghiên cứu trên mô hình trại nuôi công nghiệp

O138 và O139 là phổ biến (trong đó O139 chiếm tỷ lệ cao nhất).

Như vậy, tỷ lệ các serotyp kháng nguyên O của các chủng vi khuẩn *E.coli* gây bệnh có thể liên quan đến yếu tố địa lý, các vùng khác nhau có thể có tỷ lệ lưu hành serotyp khác nhau. Hơn nữa, tỷ lệ các serotyp thường có mối quan hệ với loại bệnh và độ tuổi khác nhau của lợn. Nghiên cứu này góp phần khẳng định rằng trong điều kiện nuôi công nghiệp vẫn có sự khác nhau về tỷ lệ lưu hành các serotyp kháng nguyên O của vi khuẩn *E.coli* theo tuổi của lợn con.

3.3.2. Kết quả xác định serotyp của các chủng *Salmonella* phân lập được

Từ các kết quả về cấu trúc kháng nguyên O và H của các chủng vi khuẩn *Salmonella* cho thấy tất cả 3 chủng đều là *S. typhimurium* (Bảng 4).

S.choleraesuis là tác nhân gây bệnh thể cấp tính (thể bệnh quan trọng nhất). Chủng này được tìm thấy với tỷ lệ cao nhất từ các nghiên cứu trước đây tại Việt Nam. Theo Lê Văn Tạo và Nguyễn Thị Vui (1994); Tạ Thị Vịnh và Đặng

Bảng 2. Đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được

Tên phản ứng	Kết quả			
	<i>E.coli</i> (n=57)		<i>Salmonella</i> spp. (n=3)	
	Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)	Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)
Dung huyết	30	52,63	-	-
Indol	57	100	0	0
MR	57	100	3	100
VP	0	0	0	0
Citrat	0	0	3	100
TSI (H ₂ S)	-	-	3	100
Arabinose	-	-	3	100
Inositol	0	0	-	-
Dextrose	-	-	3	100
Lactose	57	100	0	0
Galactose	-	-	3	100
Maltose	57	100	3	100
Manitol	57	100	3	100
Mannose	57	100	-	-
Sorbitol	57	100	3	100
Xylose	57	100	-	-

Bảng 3. Kết quả xác định các serotyp kháng nguyên O của các chủng *E.coli* phân lập

Nguồn gốc phân lập	Số chủng	Serotype O	Kết quả	
			Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)
Lợn con theo mẹ	25	O8	2	8,0
		O64	3	12,0
		O101	5	20,0
		O149	12	48,0
Lợn sau cai sữa	32	O138	3	9,3
		O139	9	28,1
		O141	14	43,7
		O149	3	9,3

Khánh Vân (1996), *Salmonella* tìm thấy ở lợn chủ yếu là *S. choleraesuis* nhưng trong nghiên cứu này, không có chủng vi khuẩn *Salmonella* nào thuộc serotyp *S. choleraesuis*. Nghiên cứu mới đây của Nguyễn Mạnh Phương và cs. (2012) cho thấy trên 50% số chủng *Salmonella* phân lập từ lợn sau cai sữa tại các trang trại chăn nuôi công nghiệp mắc tiêu chảy là *S. typhimurium*. Nghiên cứu này góp phần khẳng định cho nhận xét của các tác giả trên rằng thành phần chủng *Salmonella* tại các trang trại chăn nuôi lợn có thể đã thay đổi hoặc trong điều kiện chăn nuôi theo quy mô công nghiệp ở miền Bắc, chủng *Salmonella* phổ biến là *S. typhimurium* chứ không phải *S. choleraesuis*.

3.4. Kết quả kiểm tra độc lực của một số chủng E.coli và Salmonella phân lập

Từ các kết quả nghiên cứu về đặc tính hình thái, nuôi cấy, tính chất sinh vật hóa học, xác định một số yếu tố gây bệnh của các chủng vi khuẩn phân lập được, 22 chủng vi khuẩn *E.coli* có các đặc tính sinh vật hóa học điển hình đại

diện cho các serotyp và 3 chủng *Salmonella* đã được kiểm tra độc lực trên chuột nhắt trắng. Kết quả (Bảng 5) cho thấy chỉ có 1 chủng *E.coli* phân lập từ lợn con theo mẹ và 1 chủng phân lập từ lợn con sau cai sữa không gây chết chuột; đa số các chủng gây chết toàn bộ chuột thí nghiệm. Thời gian gây chết chuột sớm nhất là sau 24 giờ và muộn nhất là 72 giờ sau khi tiêm truyền. Tuy nhiên, tỷ lệ chủng phân lập từ lợn con theo mẹ gây chết 100% chuột thí nghiệm cao hơn tỷ lệ này của các chủng phân lập từ lợn con sau cai sữa.

Nghiên cứu của Trương Quang (2005) cho thấy trong 30 chủng *E.coli* phân lập được từ phân của lợn từ 1-60 ngày tuổi bị tiêu chảy tại Hà Nội có 27 chủng gây chết 100% và 3 chủng gây chết 50% chuột thí nghiệm sau tiêm 24-72 giờ, không phân biệt nguồn gốc phân lập từ lợn theo mẹ hay từ lợn con sau cai sữa. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy các chủng *E.coli* phân lập từ lợn con theo mẹ mắc HCTC có thể có độc lực cao hơn các chủng phân lập từ lợn con sau cai sữa mắc hội chứng này.

Bảng 4. Kết quả xác định serotyp của các chủng vi khuẩn Salmonella phân lập được

Số chủng kiểm tra	Serotype	Công thức kháng nguyên			Số chủng (+)
		KNO	KNH		
			Pha 1	Pha 2	
n = 3	<i>S. typhimurium</i>	4	i	1,2	3
	<i>S. agona</i>	4	i	1,6	0
	<i>S. meleagridis</i>	3,1	e,h	l,w	0
	<i>S. ruzizi</i>	3,1	i	Z6	0
	<i>S. anatum</i>	3,1	e,h	1,6	0

Ghi chú: i, e, h, l, w, Z: Kháng nguyên H của các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập được

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

Vi khuẩn phân lập	Nguồn gốc phân lập	Số chuột tiêm (con)	Số Chủng	Kết quả thử độc lực						
				Giết 100% chuột		Giết 50% chuột		Không làm chết chuột		Thời gian chết sau tiêm (giờ)
				Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)	
<i>E.coli</i>	LCTM	26	13	9	69,2	3	23,06	1	7,7	
	LSCS	18	9	5	55,5	4	44,4	0	0	24-72
	Tính chung	44	22	14	63,63	7	31,8	1	4,5	24-72
<i>Salmonella</i>	LSCS	6	3	3	100	-	-	-	-	24-72

Ghi chú: LCTM = Lợn con theo mẹ; LSCS = Lợn sau cai sữa.

Cả 3 chủng *S. typhimurium* phân lập từ lợn con sau cai sữa mắc tiêu chảy giết chết 100% chuột bị gây nhiễm.

Như vậy các chủng vi khuẩn phân lập được từ lợn mắc tiêu chảy tại trại có độc lực cao và là nguyên nhân quan trọng trong hội chứng tiêu chảy ở lợn trước và sau cai sữa tại trang trại nghiên cứu.

3.5. Kết quả xác định gen mã hóa một số yếu tố gây bệnh

3.5.1. Kết quả xác định một số gen mã hóa độc tố của các chủng *E.coli* phân lập được

Đã tiến hành xác định sự có mặt của gen mã hóa độc tố chịu nhiệt (STa và STb) và độc tố không chịu nhiệt của các chủng *E.coli* phân lập được (Bảng 6).

Nghiên cứu của Trịnh Quang Tuyên (2006) cho thấy *E.coli* phân lập từ lợn sơ sinh đến 21 ngày tuổi có số chủng sản sinh độc tố STb chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp đến là STa và thấp nhất là số chủng sản sinh độc tố LT. Đặng Xuân Bình (2008) khi xác định khả năng sản sinh độc tố của 96 chủng *E.coli* phân lập được từ phân và bệnh phẩm lợn con sơ sinh đến 35 ngày tuổi cho thấy số chủng sản sinh ra ST chiếm tỷ lệ cao, tiếp đến là chủng sản sinh LT và tổ hợp LT+ST. Hoàng Văn Tuấn (1998) cho biết 80% số chủng *E.coli* có khả năng sản sinh độc tố không chịu nhiệt, 40% số chủng sản sinh độc tố chịu nhiệt và 40% số chủng sản sinh cả hai loại độc tố này. 40% số chủng *Salmonella* sản sinh độc tố không chịu nhiệt và 20% sản sinh độc tố chịu nhiệt và 20% sản sinh cả hai loại độc tố. Nghiên cứu của Đặng Xuân Bình (2008) cho thấy tỷ lệ các chủng vi khuẩn *E.coli* phân lập được từ bệnh phẩm lợn

con theo mẹ mắc bệnh phân trắng tại Thái Nguyên, Cao Bằng, Hà Tây, Bắc Ninh sản sinh độc tố ST chiếm cao nhất, tiếp đến là tỷ lệ các chủng sản sinh độc tố LT. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, nếu tính chung cho cả hai nhóm đối tượng lợn con, sự tương đồng tỷ lệ chủng *E. coli* phân lập từ lợn sau cai sữa mang gen mã hóa STa, STb và LT so với các nghiên cứu trước đây. Tuy nhiên, nếu so sánh tỷ lệ các chủng mang gen quy định độc tố phân lập từ hai nhóm lợn con thấy rằng tỷ lệ chủng *E. coli* phân lập từ lợn sau cai sữa mang gen mã hóa STa và LT cao hơn tỷ lệ các chủng phân lập từ lợn con theo mẹ mang các gen này ($P<0,05$) và ngược lại, tỷ lệ chủng phân lập từ lợn con theo mẹ mang gen mã hóa STb cao hơn tỷ lệ các chủng phân lập từ lợn sau cai sữa mang gen này ($P<0,05$).

3.5.2. Kết quả xác định kháng nguyên bám dính của các chủng *E.coli* phân lập được

Yếu tố bám dính có vai trò quan trọng đối với quá trình gây bệnh của vi khuẩn *E.coli*. Trong thí nghiệm này, kết quả xác định sự có mặt của gen mã hóa yếu tố bám dính được trình bày ở bảng 7.

Đối với lợn trước cai sữa, số chủng mang yếu tố F4 chiếm 44%; F18 chiếm 32%. Với lợn sau cai sữa chỉ tìm thấy duy nhất yếu tố bám dính F18, có tỷ lệ là 34,3%.

Lý Thị Liên Khai (2001) xác định 14,3% chủng *E.coli* phân lập từ lợn con theo mẹ mắc tiêu chảy tại TP Hồ Chí Minh mang yếu tố bám dính F4. Trong khi đó Võ Thành Thìn và cs. (2009) cho biết tỷ lệ các chủng *E.coli* phân lập từ lợn con mắc bệnh tiêu chảy tại một số tỉnh Nam Trung bộ và Tây Nguyên mang yếu tố bám dính

Bảng 6. Xác định gen mã hóa STa, STb và LT của các chủng *E.coli* phân lập

Nguồn gốc phân lập	Số chủng (n)	Gen được phát hiện					
		STa	Tỷ lệ (%)	STb	Tỷ lệ (%)	LT	Tỷ lệ (%)
Lợn con theo mẹ	25	8	32	11	44	6	24
Lợn con sau cai sữa	32	21	65,6	7	21,8	19	59,4
Tính chung	57	29	50,9	18	31,6	25	43,8

Bảng 7. Kết quả xác định kháng nguyên bám dính của các chủng *E.coli* phân lập

Yếu tố bám dính	Chủng <i>E.coli</i> phân lập từ lợn con theo mẹ (n =25)		Chủng <i>E.coli</i> phân lập từ lợn con sau cai sữa (n= 32)	
	Dương tính	Tỷ lệ%	Dương tính	Tỷ lệ (%)
F4	11	44	0	0
F18	8	32	11	34,3

F18 là 44,02%; F4 là 29,89%. Đỗ Ngọc Thúy và cs. (2008) cũng đã xác định F4 và F18 được phát hiện với tỷ lệ cao ở các chủng *E.coli* phân lập từ lợn con mắc tiêu chảy. Như vậy có thể nhận xét rằng địa điểm lấy mẫu, thời điểm lấy mẫu và độ tuổi lợn có ảnh hưởng đến tỷ lệ các chủng mang yếu tố bám dính nhất định nào đó.

3.6. Kết quả xác định gen mã yếu tố thẩm xuất của các chủng *Salmonella* phân lập

Với 3 chủng *Salmonella* được xác định thì có 2 chủng mang gen mã hóa độc tố thẩm xuất nhanh (RPF) và 2 chủng mang gen mã hóa độc tố thẩm xuất chậm (DPF). Có 1 trong số 3 chủng phân lập mang cả hai yếu tố này. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh RPF của vi khuẩn *Salmonella* có cấu trúc giống như ST của vi khuẩn *E.coli* và là yếu tố độc lực giúp vi khuẩn *Salmonella* xâm nhập vào tế bào biểu mô ruột. Trong khi đó DPF có thành phần giống độc tố LT của vi khuẩn *E.coli*. Hai yếu tố RPF và DPF đóng vai trò quan trọng trong quá trình xâm

nhập của vi khuẩn *Salmonella*. Sự có mặt của hai yếu tố này ở các chủng *Salmonella* phân lập được cho thấy vai trò gây bệnh của chúng trên lợn nghiên cứu.

3.7. Kết quả xác định tính miễn cảm với một số kháng sinh của các chủng *E.coli* và *Salmonella* phân lập được

Các chủng *E.coli* phân lập được đặc biệt miễn cảm với apramycin, certifur và amikacin (100% số chủng) tiếp đến là cephalothin và norfloxacin. Tuy nhiên, 100% chủng kiểm tra đều kháng tetracycline. Với các kháng sinh thông dụng như trimethoprim/sunfamethazole, spectinomycin và gentamycin, tỷ lệ số chủng kháng đều chiếm trên 80% số chủng kiểm tra.. Tương tự, tất cả các chủng *Salmonella* phân lập được miễn cảm với apramycin, cephalothin, amikacin, certiofur và kháng tetramycin. Số chủng kháng gentamycin và enrofloxacin là 2/3 chủng (Bảng 8).

Bảng 8. Tính miễn cảm với một số loại kháng sinh của các *E.coli* và *Salmonella* phân lập được

STT	Loại kháng sinh	<i>E.coli</i> (n=57)				<i>Salmonella typhimurium</i> (n=3)			
		Miễn cảm		Kháng		Miễn cảm		Kháng	
		Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)
1	Tetracycline	0	0	57	100	0	0	3	100
2	Trimethoprim/ Sulphamethexazole	6	10,6	51	89,4	2	66,66	1	33,34
3	Spectinomycin	5	8,7	52	91,3	2	66,66	1	33,34
4	Gentamycin	9	15,8	48	84,2	1	33,34	2	66,66
5	Apramycin	57	100	0	0	3	100	0	0
6	Cephalothin	55	96,5	2	3,5	3	100	0	0
7	Amikacin	57	100	0	0	3	100	0	0
8	Ceftifur	57	100	0	0	3	100	0	0
9	Enrofloxacin	39	68,4	18	31,6	1	33,34	2	66,66
10	Norfloxacin	45	78,9	12	21,1	2	66,66	1	33,34

Khả năng kháng kháng sinh của *E.coli* và *Salmonella* có thể thay đổi phụ thuộc vào địa phương và thời điểm làm kháng sinh đồ và loài vật nuôi (Phùng Quốc Chương, 2005). Xác định tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn *Salmonella* phân lập được, nhiều tác giả đã khẳng định nhiều loại kháng sinh thông thường như: Streptomycin, Ampicillin... đã bị vi khuẩn *Salmonella* kháng lại với tỷ lệ cao (Cù Hữu Phú và cs., 1999; Đỗ Trung Cứ và cs., 2003).

Như vậy các chủng vi khuẩn phân lập miễn cảm cao với một số loại kháng sinh mới xuất hiện trên thị trường Việt Nam như Ceftifur, Amikacin và Apramycin trong khi có tính kháng cao với những loại kháng sinh khác.

Tóm lại, nghiên cứu này cho thấy tỷ lệ phân lập cao đối với vi khuẩn *E.coli* từ mẫu phân lợn con mắc HCTC cả hai lứa tuổi (lợn con theo mẹ và lợn con sau cai sữa). Tỷ lệ phân lập cao hơn từ lợn con theo mẹ. Có sự sai khác về tỷ lệ các serotyp kháng nguyên O; tỷ lệ chủng mang yếu tố bám dính; tỷ lệ chủng mang các các gen mã hóa STa và LT giữa hai nhóm chủng có nguồn gốc phân lập từ lợn con theo mẹ và lợn sau cai sữa. Các chủng phân lập từ lợn con theo mẹ có độc lực cao hơn các chủng phân lập từ lợn con sau cai sữa khi tiêm truyền qua chuột thí nghiệm. Trong khi đó vi khuẩn *Salmonella* chỉ phân lập được từ mẫu phân của lợn sau cai sữa với tỷ lệ thấp nhưng tất cả các chủng phân lập đều có độc lực cao khi tiêm truyền qua chuột thí nghiệm.

5. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy vi khuẩn *E.coli* và *Salmonella* là những yếu tố đóng vai trò quan trọng trong HCTC ở lợn con trong chăn nuôi công nghiệp. Tuy nhiên, trong điều kiện nuôi công nghiệp như nghiên cứu này, *E.coli* có khả năng đóng vai trò “trội” so với *Salmonella*.

Sự khác nhau về tỷ lệ các chủng thuộc serotyp kháng nguyên O149, O141; chủng mang yếu tố bám dính F4, F18 cũng như độc tố STa, STb và LT có thể liên quan sự khác nhau về độc lực của vi khuẩn *E.coli* từ đó quyết định vai trò “trội” của *E.coli* trong HCTC của lợn con theo mẹ trong chăn nuôi công nghiệp.

Các nghiên cứu tiếp theo trên các đối tượng lợn ở nhiều trang trại khác nhau cũng như các nghiên cứu đối chứng trên đối tượng lợn nuôi theo phương thức truyền thống sẽ khẳng định vai trò của *E.coli* và *Salmonella* trong HCTC ở lợn nuôi công nghiệp, với từng lứa tuổi lợn con cũng như mối liên quan giữa các yếu tố độc lực của vi khuẩn với lứa tuổi lợn mắc HCTC.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đặng Xuân Bình, Đỗ Văn Chung (2008) Đặc tính sinh học của vi khuẩn *E.coli* trong bệnh phân trắng lợn con một số tỉnh miền núi phía Bắc. Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y, 15(4): 54-59.
- Phùng Quốc Chương (2005) Kết quả kiểm tra tính miễn cảm của một số thuốc kháng sinh của vi khuẩn *Salmonella* phân lập từ vật nuôi tại Đắk Lắk”. Tạp chí KHKT thú y, 1: 53.
- CLSI (2007) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Seventeenth informational supplement M100-S17 Vol 27 No.1 Replaces M100-S16 Vol 26 No.3. Truy cập tại địa chỉ <http://www.microbiolab-bg.com/CLSI.pdf>
- Đỗ Trung Cứ, Trần Thị Hạnh, Nguyễn Quang Tuyên, Đỗ Thị Lan Phương (2003). Xác định một số yếu tố gây bệnh của *Salmonella* Typhimurium phân lập từ lợn bị tiêu chảy ở một số tỉnh miền núi phía bắc. Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y, 4: 33-37.
- Fairbrother.J.M (1992). Enteric colibacillosis Diseases of swine. IOWA State University Press/AMES, IOWA U.S.A 7th Edition, 1992,489-497Foley 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.
- Vũ Khắc Hùng, M. Pilipinec (2004). Nghiên cứu và so sánh các yếu tố độc lực của các chủng *E.coli* phân lập từ lợn con bị tiêu chảy ở cộng hoà Slovakia. Báo cáo khoa học chăn nuôi thú y, Hà Nội, tr. 45-46.
- Lý Thị Liên Khai (2001). Phân lập xác định độc tố ruột của các chủng *E.coli* gây bệnh tiêu chảy cho heo con. Tạp chí khoa học kỹ thuật Thú y, 8(3),13-28
- Nguyễn Thị Kim Lan (2004). Thử nghiệm phòng và trị bệnh coli dung huyết cho lợn con ở Thái Nguyên và Bắc Giang, Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y, 12(3): 35 - 39.
- Nguyễn Thị Ngữ (2005). Nghiên cứu tình hình hội chứng tiêu chảy ở lợn tại huyện Chương Mỹ, Hà Tây, xác định một số yếu tố gây bệnh của vi khuẩn *E.coli* và *Salmonella*, biện pháp phòng trị, Luận văn thạc sỹ Nông nghiệp, Hà Nội.

- Nguyễn Khả Ngự (2000). Xác định các yếu tố gây bệnh của vi khuẩn *E.coli* trong bệnh phù đầu lợn con ở đồng bằng sông Cửu Long, chế vacxin phòng bệnh, Luận án tiến sĩ Nông nghiệp, Viện Thú y, Hà Nội.
- Nguyễn Thị Oanh (2003). Tình hình nhiễm và một số yếu tố gây bệnh của vi khuẩn *Salmonella* ở vật nuôi (Lợn, trâu, bò, nai, voi) tại Đắk Lắk. Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Hà Nội.
- Cù Hữu Phú, Nguyễn Ngọc Nhiên, Vũ Bình Minh và Đỗ Ngọc Thuý (1999). Kết quả phân lập vi khuẩn *E.coli* và *Salmonella* ở lợn mắc tiêu chảy, xác định một số đặc tính sinh vật hoá học của chúng vi khuẩn phân lập được và biện pháp phòng trị. *Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y*, 47-51.
- Cù Hữu Phú, Nguyễn Ngọc Nhiên, Đỗ Ngọc Thuý, Âu Xuân Tuấn, Nguyễn Xuân Huyền, Văn Thị Hương, Đào Thị Hào (2004). Lựa chọn chủng *E.coli* để chế tạo Autovacxin phòng bệnh tiêu chảy cho lợn con theo mẹ. Viện thú y 35 năm xây dựng và phát triển (1969 - 2004), NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
- Nguyễn Mạnh Phương, Nguyễn Bá Tiếp, Văn Thị Hương, Cù Hữu Phú (2012). 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. *Tạp chí khoa học và phát triển*, 2: 315-324
- Popoff M.Y (2001). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovas. 8th 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*, 2(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*, 14(6): 52-57.
- Trương Quang (2005). Kết quả nghiên cứu vai trò gây bệnh của *E.coli* trong hội chứng tiêu chảy ở lợn 1-60 ngày tuổi. *Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y*, 12(1): 27-32.
- 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.
- Võ Thành Thìn, Đặng Văn Tuấn, Nguyễn Hữu Hưng (2009). Ứng dụng phương pháp PCR-RFLP để xác định các biến thể của kháng nguyên F4 và F18 của các chủng *E.coli* gây tiêu chảy ở lợn con. *Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y*, 16(5): 26-30.
- Đỗ Ngọc Thuý, Lê Thị Minh Hằng, Lê Thị Hoài (2008). Đặc tính của một số chủng vi khuẩn *E.coli* phân lập từ lợn mắc tiêu chảy ở tỉnh Hưng Yên. *Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y*, 15(4): 49-53.
- Nguyễn Trung Trực, Nguyễn Việt Nga, Thái Quốc Hiếu, Lê Thanh Hiếu, Nguyễn Ngọc Tuấn, Trần Thị Dân (2004). Phân lập và định type kháng nguyên vi khuẩn *E.coli* trong phân heo nái, heo con tại tỉnh Tiền Giang. *Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y*, (1), 12-19.
- Hoàng Văn Tuấn, Lê Văn Tạo, Trần Thị Hạnh (1998). Kết quả điều tra tình hình tiêu chảy ở lợn trong một trại giống hướng nạc, *Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y*, 5(4).
- Trịnh Quang Tuyên (2004). Phân lập và xác định các yếu tố gây bệnh của vi khuẩn *E.coli* từ lợn con bị tiêu chảy nuôi tại trại lợn Tam Điệp. *Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y* (4), 22-28.
- Trịnh Quang Tuyên (2006). Xác định các yếu tố gây bệnh của *E.coli* trong bệnh tiêu chảy và phù đầu ở lợn con chăn nuôi tập trung. Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Viện thú y, Hà Nội.
- Tạ Thị Vịnh, Đặng Khánh Vân (1996). Bước đầu xác định *E.coli* và *Salmonella* trên lợn bình thường và trên một số lợn mắc hội chứng tiêu chảy ở Hà Nội và Hà Tây. Kỳ yếu kết quả nghiên cứu khoa học, khoa Chăn nuôi thú y, Đại học Nông nghiệp I Hà Nội, 130.