

DOI:10.22144/ctu.jvn.2018.070

KHẢO SÁT BỆNH VIÊM PHỔI, MÀNG PHỔI DO VI KHUẨN *Actinobacillus pleuropneumoniae* TRÊN HEO TẠI TỈNH BẾN TRE

Phan Kim Thanh^{1*}, Huỳnh Văn Thắm² và Lý Thị Liên Khai²

¹Khoa Nông nghiệp, Trường Cao đẳng Cơ điện và Nông nghiệp Nam Bộ

²Bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Phan Kim Thanh (email: phankimthanh78@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/10/2017

Ngày nhận bài sửa: 15/01/2018

Ngày duyệt đăng: 19/06/2018

Title:

Investigation of porcine pleuropneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Ben Tre province

Từ khóa:

Actinobacillus pleuropneumoniae, bệnh viêm phổi màng phổi, tỉnh Bến Tre

Keywords:

Actinobacillus pleuropneumoniae, *pleuropneumoniae*, Ben Tre province

ABSTRACT

This study was done to identify the prevalence, serotypes, and antibiotic susceptibility test of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) strains causing porcine pleuropneumonia in Ben Tre province. Isolation and identification of APP from 144 nasal swabs, 15 tonsil and 15 lung samples collected from pigs at any ages, at farms, households, and slaughterhouses by PCR method, antibiotic sensitivity testing by disk diffusion method. The rate of respiratory disease in swine in Ben Tre province was 11.52%. The rate of *Actinobacillus* spp. was 45.14% (65/144); APP was 24.62% (16/65). In 16 positive APP strains, there were 5 strains of serotype 4; 1 strains of serotype 6 and 10 strains of serotype 9, 11. The isolated APP strains were sensitive to amoxicillin/clavulanic acid (100%), tulathromycin (81.25%), gentamicin (68.75%); multi-resistant to at least 4 to 9 antibiotics including florfenicol, tetracycline, ampicillin, amoxicillin, bactrim, norfloxacin, neomycin, tobramycin, streptomycin.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát sự lưu hành, xác định serotype và kiểm tra sự nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) gây bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo tại tỉnh Bến Tre. Các serotype vi khuẩn APP được xác định và định danh dựa vào gene độc tố *apx* từ 114 mẫu dịch xoang mũi, 15 mẫu hạch hạnh nhân và 15 mẫu phổi heo ở các lứa tuổi tại các trại, hộ chăn nuôi và lò giết mổ gia súc tại tỉnh Bến Tre bằng phương pháp PCR, kiểm tra sự nhạy cảm kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Kết quả cho thấy tỷ lệ bệnh hô hấp trên heo tại tỉnh Bến Tre là 11,52%. Tỷ lệ phân lập được vi khuẩn *Actinobacillus* spp. là 45,14% (65/144); APP là 24,62% (16/65). Trong 16 chủng vi khuẩn APP phân lập được có 5 chủng thuộc serotype 4; 1 chủng thuộc serotype 6 và 10 chủng thuộc serotype 9, 11. Vi khuẩn APP gây bệnh viêm phổi, màng phổi nhạy cảm với kháng sinh amoxicillin/clavulanic acid (100%), tulathromycin (81,25%), gentamicin (68,75%); và đa kháng với ít nhất 4 đến 9 loại kháng sinh gồm florfenicol, tetracycline, ampicillin, amoxicillin, bactrim, norfloxacin, neomycin, tobramycin, streptomycin.

Trích dẫn: Phan Kim Thanh, Huỳnh Văn Thắm và Lý Thị Liên Khai, 2018. Khảo sát bệnh viêm phổi, màng phổi do vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* trên heo tại tỉnh Bến Tre. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(4B): 54-63.

1 GIỚI THIỆU

Vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) là một trong những nguyên nhân gây bệnh viêm phổi, màng phổi cho tất cả các lứa tuổi heo trên toàn thế giới. Ở thể cấp tính, bệnh viêm phổi, màng phổi do APP có thể làm heo chết đột ngột (Wendy, 2016). Đường truyền lây chủ yếu của bệnh có thể trực tiếp từ các cá thể với nhau hoặc gián tiếp qua không khí (Amanda, 2012). Theo Ho To *et al.* (2016), vi khuẩn APP gây ra bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo có 15 serotype khác nhau. Các serotype này được chia thành 2 biotype. Biotype I bao gồm 14 serotype (serotype 1-13 và 15); bitotype II bao gồm 7 serotype (serotype 2, 4, 7, 9, 11, 13 và 14). Độc lực của các serotype phụ thuộc nhiều nhân tố như *apx*, CPS (capsule polysaccharide), LPS (lipopolysaccharide),... nhưng nhân tố chính gây nên những biểu hiện lâm sàng và bệnh tích của bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo là ngoại độc tố *apx* bao gồm *apxI*, *apxII*, *apxIII* và *apxIV*.

Một số nghiên cứu tại Việt Nam cho thấy bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo do APP đang là căn bệnh hô hấp rất phổ biến hiện nay và dễ dàng kể phát từ các bệnh gây suy giảm miễn dịch khác. Các báo cáo của Lê Văn Dương và *ctv.* (2012), Nguyễn Quốc Huy và *ctv.* (2013) nghiên cứu từ những mẫu bệnh phẩm ở heo dương tính với virus PRRS tại Bắc Giang đã cho kết quả 19,59% và 17,78% số mẫu được phân lập dương tính với vi khuẩn APP.

Tại tỉnh Bến Tre, tổng đàn heo tăng lên từng năm, đến năm 2016 là 702.825 con (Cục Thống kê tỉnh Bến Tre), bên cạnh đó việc vận chuyển và buôn bán heo thịt trong và ngoài địa phương rất phổ biến, do đó nguy cơ bùng phát dịch bệnh nói chung và bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo nói riêng rất dễ xảy ra. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về mức độ lây nhiễm cũng như các serotype của APP gây bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo ở tỉnh Bến Tre. Xuất phát từ những vấn đề trên, nghiên cứu về tỷ lệ heo bệnh viêm phổi, màng phổi do vi khuẩn APP, định danh các serotype của vi khuẩn APP và kiểm tra sự nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn APP phân lập được trên heo tại tỉnh Bến Tre được thực hiện.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Có 114 mẫu dịch xoang mũi, 15 mẫu phổi và 15 mẫu hạch hạnh nhân được thu thập trên heo có biểu hiện triệu chứng và bệnh tích của bệnh viêm phổi, màng phổi tại các trại heo và lò mổ thuộc huyện Mỏ Cày Nam, Mỏ Cày Bắc, Chợ Lách và thành phố Bến Tre thuộc tỉnh Bến Tre.

Kháng sinh gồm 11 loại: ampicillin (Am) 10µg, amoxicillin (Ax) 10µg, amoxicillin/clavulanic acid (Ac) 20/10µg, bactrim (Bt, sulfamethoxazole/trimethoprim) 1,25/23,75 µg, gentamycin (Ge) 30µg, norfloxacin (Nr) 10µg, neomycin (Ne) 30µg, streptomycine (Sm) 10µg, tulathromycin 30µg, tobramycin 10µg (Nam Khoa, Việt Nam) và florfenicol (FFc) 30µg (Oxoid, UK).

Primer mã hoá gene độc tố *apxIVA*, *apxICA*, *apxIICA*, *apxIIICA*, *apxIBD*, *apxIIIBD* (Bioline, USA) dùng xác định và định danh các serotype của vi khuẩn APP bằng phương pháp PCR (Frey *et al.*, 2002; Satrán *et al.*, 2002; Sthitmatee *et al.*, 2003; Rayamajhi *et al.*, 2005).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phương pháp lấy mẫu

Lấy mẫu theo phương pháp của OIE (2009). Heo được chọn lấy mẫu đại diện cho ô chuồng, có triệu chứng và bệnh tích điển hình của bệnh viêm phổi, màng phổi do vi khuẩn APP gây ra như thờ khó dữ dội, ngòì thờ hoặc nằm thờ, vùng da tai tím tái, phổi và hạch hạnh nhân xuất huyết viêm dính, chảy máu mũi trước khi chết. Bảo quản mẫu ở nhiệt độ 2-8°C.

2.2.2 Phương pháp phân lập vi khuẩn

Mẫu dịch xoang mũi, phổi và hạch hạnh nhân được nuôi cấy, phân lập trên môi trường thạch chocolate, đem ủ trong điều kiện 5-10% CO₂ ở 37°C trong 24-48 giờ (Quinn *et al.*, 2004). Quan sát các khuẩn lạc vi khuẩn APP trên môi trường thạch chocolate nhỏ 0,5-1 mm, màu xám, trong mờ và trơn nhẵn (Pozzi *et al.*, 2011).

2.2.3 Phương pháp xác định và định danh các serotype của vi khuẩn APP

a. Ly trích DNA của vi khuẩn

DNA của vi khuẩn APP được ly trích theo phương pháp shock nhiệt của Kucerova *et al.* (2005). Sau khi tăng sinh vi khuẩn APP trên môi trường chocolate, thu sinh khối vi khuẩn cho vào ống eppendorf có chứa 0,5 ml nước cất vô trùng, lắc đều rồi đun cách thủy ở 100°C trong 10 phút. Sau đó tiến hành ly tâm huyền dịch trong eppendorf với vận tốc 10.000 vòng/phút trong 15 phút. Tiếp theo rút lấy dịch trong bên trên, đây là mẫu DNA cho quá trình PCR. Trữ mẫu DNA ở -20°C với OD tương đương 50 ng/ml.

b. Xác định vi khuẩn APP bằng kỹ thuật PCR

Xác định vi khuẩn APP dựa vào gene độc tố *apxIVA* bằng phương pháp PCR theo Rayamajhi *et al.* (2005) với trình tự primer được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1: Trình tự primer của gene độc tố *apxIVA* (Rayamajhi *et al.*, 2005)

Gene	Trình tự primer (5' - 3')	Kích thước phân tử (bp)	Serotype group
<i>apxIVA</i>	(F) GCG AAA CAA TTC GAA GGG	1600	4, 9, 11
	(R) GGC CAT CGA CTC AAC CAT	2000	6
		2400	1, 3, 12,13,14
		2800	2, 5, 8,10, 15

F: forward: xuôi; R: reverse: ngược.

c. Định danh các serotype của vi khuẩn APP bằng phương pháp PCR

phương pháp PCR theo Frey *et al.* (2002) với trình tự primer được trình bày ở Bảng 2.

Định danh các serotype của vi khuẩn APP bằng

Bảng 2: Trình tự primer của các cặp đoạn mồi dùng xác định và định danh các serotype của vi khuẩn APP bằng phương pháp PCR (Frey *et al.*, 2002)

Gene	Trình tự primer (5' - 3')	Kích thước (bp)
<i>apxICA</i>	(F) TTGCTCGCTAGTTGCGGAT	2.420
	(R) TCCCAAGTTCGAATGGGCTT	
<i>apxIICA</i>	(F) CCATACGATATTGGAAGGGCAAAT	2.088
	(R) TCCCCGCCATCAACGGT	
<i>apxIIICA</i>	(F) CCTGGTTCTACAGAAGCGAAAATC	1.755
	(R) TTTCGCCCTTAGTTGGATCGA	
<i>apxIBD</i>	(F) GTATCGGCGGGATTCCGT	1.447
	(R) ATCCGCATCGGCTCCCAA	
<i>apxIIIBD</i>	(F) TCCAAGCATGTCTATGGAACG	968
	(R) AACAGAATCAAATCAGCTTGGTT	

F: forward: xuôi; R: reverse: ngược

Kết quả sau khi điện di sẽ được đối chiếu sự hiện diện của các gene *apx* trong Bảng 3 để định danh serotype của vi khuẩn APP.

Bảng 3: Sự hiện diện của các gene *apx* trong các serotype khác nhau của vi khuẩn APP (Rayamajhi *et al.*, 2005)

Serotype	<i>apxICA</i>	<i>apxIBD</i>	<i>apxIICA</i>	<i>apxIIICA</i>	<i>apxIIIBD</i>	<i>apxIVA</i>
1	+	+	+	-	-	+
2	-	+	+	+	+	+
3	+	-	-	+	+	+
4	-	+	+	+	+	+
5	+	+	+	-	-	+
6	-	+	+	+	+	+
7	-	+	+	-	-	+
8	-	+	+	+	+	+
9	+	+	+	-	-	+
10	+	+	-	-	-	+
11	+	+	+	-	-	+
12	-	+	+	-	-	+
13	-	+	+	-	-	+
14	+	+	-	-	-	+
15	-	+	+	+	+	+

2.2.4 Phương pháp kiểm tra tính nhạy cảm của vi khuẩn APP đối với kháng sinh

Kiểm tra sự nhạy cảm của vi khuẩn APP với kháng sinh được thực hiện theo phương pháp

khuyết tán trên thạch của Bauer *et al.* (1966) và đọc kết quả theo tiêu chuẩn của Viện Nghiên cứu Tiêu chuẩn Lâm sàng và Phòng thí nghiệm (CLSI, 2015).

2.2.5 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được phân tích và xác định mức ý nghĩa thống kê bằng các phương pháp Chi-square test, Chi-square Yates test, Fisher's exact test.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả khảo sát tỷ lệ bệnh hô hấp trên heo tại tỉnh Bến Tre

Kết quả khảo sát 6.847 con heo từ tháng 8/2016 đến 5/2017 tại tỉnh Bến Tre cho thấy có 789 heo mắc bệnh đường hô hấp, chiếm tỷ lệ 11,52%. Như vậy, bệnh hô hấp trên heo tại tỉnh Bến Tre là khá phổ biến. Tỷ lệ bệnh hô hấp trên heo của huyện Chợ Lách là cao nhất (14,71%), kế đến là thành phố Bến Tre (12,31%), Mô Cày Bắc (8,29%) và thấp nhất là Mô Cày Nam (7,80%), sự sai khác này rất có ý nghĩa thống kê (P=0,000). Huyện Chợ Lách và thành phố Bến Tre là hai địa phương có những khu tập kết mua bán, vận chuyển heo thịt, heo giống nhiều, chăn nuôi có diện tích thu hẹp nên mật độ đàn khá cao. Đây có thể là những nguyên nhân làm cho tỷ lệ heo bị bệnh hô hấp tại Chợ Lách và thành phố Bến Tre cao hơn hai huyện Mô Cày Nam và Mô Cày Bắc.

Bảng 4: Kết quả khảo sát tỷ lệ bệnh hô hấp trên heo tại tỉnh Bến Tre

Địa điểm (huyện)	Tổng đàn khảo sát (con)	Số con có triệu chứng bệnh hô hấp (con)	Tỷ lệ (%)
Mô Cày Nam	2.116	165	7,80
Mô Cày Bắc	350	29	8,29
Chợ Lách	2.216	326	14,71
Thành phố Bến Tre	2.185	269	12,31
P = 0,000			
Tổng cộng	6.847	789	11,52

Kết quả nghiên cứu này thấp hơn kết quả nghiên cứu của Loera-Muro *et al.*(2013) ở các trang trại vùng Aguascalientes, Mexico là 35,7% và cao hơn kết quả nghiên cứu của Pozzi *et al.*(2011) là 8%. Có sự khác nhau giữa các kết quả nghiên cứu này có thể là do khác nhau về vùng địa lý, thời gian khảo sát sự lưu hành bệnh, các yếu tố môi trường, thời tiết, và qui mô chăn nuôi.

3.2 Kết quả phân lập vi khuẩn *Actinobacillus* spp. trên heo bị bệnh hô hấp tại tỉnh Bến Tre

Kết quả phân lập Vi khuẩn *Actinobacillus* spp. trên heo bệnh hô hấp tại tỉnh Bến Tre chiếm tỷ lệ khá cao (45,14%). Thành phố Bến Tre có tỷ lệ

nhiễm vi khuẩn *Actinobacillus* spp. cao nhất (60,00%), kế đến là Mô Cày Bắc là 41,46%, Chợ Lách 34,89% và thấp nhất là Mô Cày Nam (33,33%). Tuy nhiên, sự sai khác này là không có ý nghĩa thống kê (P=0,151). Quinn *et al.*(2004) đã nhận định vi khuẩn *Actinobacillus* spp. có thể nhiễm cho heo ở tất cả các lứa tuổi. Đặc biệt, bệnh sẽ tiến triển nhanh hơn nếu có sự kết hợp giữa các tác nhân cơ hội, khi điều kiện môi trường bất lợi và công tác quản lý kém (Brockmeier *et al.*, 2002). Do đó, kết quả tỷ lệ nhiễm *Actinobacillus* spp. trên heo tại các huyện Mô Cày Nam, Mô Cày Bắc, Chợ Lách và thành phố Bến Tre không có sự khác nhau. Tỷ lệ nhiễm *Actinobacillus* spp. tại thành phố Bến Tre cao có thể là do việc tập kết, mua bán heo tại đây diễn ra thường xuyên, mầm bệnh có điều kiện tiếp xúc tấn công gây bệnh.

Bảng 5: Kết quả phân lập vi khuẩn *Actinobacillus* spp. trên heo bệnh hô hấp tại tỉnh Bến Tre

Địa điểm (huyện)	Số mẫu kiểm tra (mẫu)	Số mẫu dương tính (mẫu)	Tỷ lệ (%)
Mô Cày Nam	59	28	33,33
Mô Cày Bắc	12	4	41,46
Chợ Lách	43	15	34,89
Thành phố Bến Tre	30	18	60,00
P = 0,151			
Tổng cộng	144	65	45,14

Kết quả này cao hơn kết quả nghiên cứu của Nguyễn Lương Trường Giang (2015) về tỷ lệ nhiễm *Actinobacillus* spp. tại thành phố Cần Thơ là 25,90%. Sự khác biệt có thể do vị trí địa lý, điều kiện tự nhiên từng vùng khác nhau; thời gian thực hiện nghiên cứu khác nhau, tập quán chăn nuôi khác nhau.

3.3 Kết quả xác định vi khuẩn APP dựa vào gene *apxIVA* bằng kỹ thuật PCR

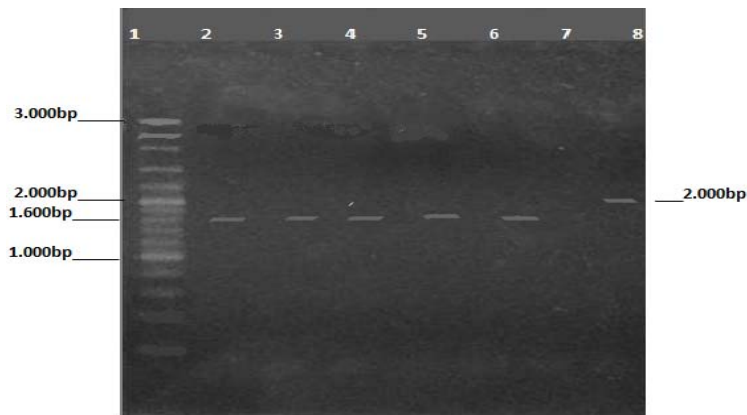
Tiến hành xác định vi khuẩn APP dựa vào gene *apxIVA* từ 65 mẫu dương tính với *Actinobacillus* spp., kết quả được trình bày qua Bảng 6.

Bảng 6: Kết quả xác định vi khuẩn APP dựa vào gene *apxIVA*

Địa điểm	Số mẫu kiểm tra (mẫu)	Số mẫu dương tính (mẫu)	Tỷ lệ (%)
Mô Cày Nam	28	9	32,14
Mô Cày Bắc	4	1	25,00
Chợ Lách	15	5	33,33
Thành phố Bến Tre	18	1	5,56
P > 0,05			
Tổng cộng	65	16	24,62

Hai huyện Mô Cày Nam và Chợ Lách có tỷ lệ dương tính với vi khuẩn APP cao và tương đương nhau lần lượt là 32,14% và 33,33% ($P=0,814$), và thấp nhất là thành phố Bến Tre (5,56%). Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($P> 0,05$). Vi khuẩn APP hiện diện đều khắp ở những trại chăn nuôi có heo bị bệnh hô hấp tại tỉnh Bến Tre. Tại Ontario-Canada, báo cáo của MacInnes *et al.* (2008) đã xác định có 78% đàn heo

trong tổng số 50 đàn được kiểm tra dương tính với vi khuẩn APP; Loera-Muro *et al.* (2013) nghiên cứu tại Aguascalientes - Mexico đã cho kết quả có 20% số mẫu dương tính với vi khuẩn APP. Điều này cho thấy APP là vi khuẩn phổ biến gây bệnh đường hô hấp trên heo tại Việt Nam và các quốc gia khác trên thế giới cũng như tại các khu vực có địa lý, thổ nhưỡng, khí hậu khác nhau thì tỷ lệ nhiễm APP trên heo cũng khác nhau.



Hình 1: Sản phẩm PCR của gene *apxIVA* của vi khuẩn APP sau quá trình điện di

Giếng 1: Marker (3000bp); giếng 2, 3, 4, 5, 6: dương tính (1.600bp);
giếng 7: âm tính; giếng 8: dương tính (2.000bp)

Bảng 7: Kết quả tỷ lệ heo bệnh viêm phổi, màng phổi do vi khuẩn APP tại tỉnh Bến Tre theo phương thức nuôi

Phương thức chăn nuôi	Số mẫu kiểm tra (mẫu)	Số mẫu dương tính (mẫu)	Tỷ lệ (%)
Hộ gia đình	37	11	29,73
Trang trại	28	5	17,86
			$P=0,271$
Tổng cộng	65	16	24,62

Ở kết quả nghiên cứu này, tỷ lệ lưu hành của vi khuẩn APP ở những đàn heo được nuôi theo phương thức hộ gia đình cao hơn trang trại, tỷ lệ lần lượt là 29,73% và 17,86%. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($P=0,271$). Điều này có thể là do vi khuẩn APP trong môi trường nuôi tại các hộ gia đình và trang trại có sự phân bố giống nhau. Nhận định của Brockmeier *et al.* (2002) cho rằng vi khuẩn APP thường có ở đường hô hấp trên của heo và dễ dàng gây bệnh cho heo khi gặp điều kiện môi trường bất lợi, điều này có thể làm cho tỷ lệ nhiễm vi khuẩn APP trong phương thức nuôi hộ gia đình và trang trại không có sự khác nhau. Mặt khác còn có thể là do hạn chế về số mẫu dương tính chưa đủ lớn để thấy được sự khác biệt.

Bảng 8: Kết quả tỷ lệ heo bệnh viêm phổi, màng phổi do vi khuẩn APP tại tỉnh Bến Tre theo lứa tuổi

Lứa tuổi	Số mẫu kiểm tra (mẫu)	Số mẫu dương tính (mẫu)	Tỷ lệ (%)
< 3 tháng tuổi	17	5	29,41
3-4 tháng tuổi	24	4	16,67
> 4 tháng tuổi	24	7	29,17
			$P=0,685$
Tổng cộng	65	16	24,62

Kết quả ở Bảng 8 cho thấy tỷ lệ heo nhiễm bệnh viêm phổi, màng phổi do vi khuẩn APP là tương đương nhau và sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê ($P=0,685$). Kết quả này tương đương với kết quả nghiên cứu của Lê Văn Dương và *ctv.* (2012) và Nguyễn Quốc Huy và *ctv.* (2013) khi nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm vi khuẩn APP ở những heo dương tính với virus PRRS tại Bắc Giang, kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm cao nhất (24,09%) ở những heo sau cai sữa từ 1,5 – 3 tháng tuổi. Quinn *et al.* (2011) khẳng định bệnh viêm phổi, màng phổi do APP có thể gây nhiễm cho heo ở tất cả các lứa tuổi. Trong nghiên cứu này, heo ở cả 3 nhóm tuổi có tỷ lệ nhiễm bệnh viêm phổi, màng phổi do vi khuẩn APP là tương đương nhau.

Bảng 9: Kết quả tỷ lệ heo bệnh viêm phổi, màng phổi do vi khuẩn APP tại tỉnh Bến Tre theo loại bệnh phẩm

Loại bệnh phẩm	Số mẫu kiểm tra (mẫu)	Số mẫu dương tính (mẫu)	Tỷ lệ (%)
Dịch xoang mũi	55	14	25,45
Phổi	5	1	20,00
Hạch hạnh nhân	5	1	20,00
			P=0,974
Tổng cộng	65	16	24,62

Kết quả tỷ lệ nhiễm vi khuẩn APP trên ba loại mẫu bệnh phẩm dịch xoang mũi, phổi và hạch hạnh nhân được trình bày ở Bảng 9 là tương đương nhau (25,45%; 20,00% và 20,00%), sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê (P=0,974). Brockmeier *et al.* (2002) đã nhận định rằng vi khuẩn APP thường có ở đường hô hấp trên, đặc biệt là ở trong xoang mũi và hạch hạnh nhân. Một nghiên cứu của Dron *et al.* (2012) về sự hiện diện của vi khuẩn APP trong dịch hầu họng ở heo bệnh tại Australia cho kết quả khá thấp, chỉ chiếm 4%. Nhưng nghiên cứu của Loera-Muro *et al.* (2013) cho kết quả tỷ lệ nhiễm APP trên mẫu dịch xoang mũi heo tại Aguascalientes - Mexico là 20%. Nghiên cứu Nguyễn Lương Trường Giang (2015) tại Cần Thơ - Việt Nam là 20%. Điều này có thể do sự khác biệt về phương thức chăn nuôi của từng vùng, mầm bệnh hiện diện trong môi trường chăn nuôi lan truyền trực tiếp từ heo bệnh sang heo khỏe, vi khuẩn APP khu trú ở các cơ quan xoang mũi, phổi và hạch hạnh nhân là phổ biến hơn bệnh phẩm ở các vị trí khác và có tỷ lệ nhiễm không khác nhau.

Bảng 10: Kết quả khảo sát tần suất xuất hiện các triệu chứng gây bệnh viêm phổi, màng phổi do vi khuẩn APP tại Bến Tre (n=16)

Triệu chứng	Số trường hợp có biểu hiện	Tỷ lệ (%)
Ho	16	100
Chảy dịch mũi	16	100
Sốt, mắt sưng	16	100
Bỏ ăn, ít đi lại	16	100
Thở khó	15	93,75
Chảy máu mũi/miệng	2	12,50

Theo nhận định của Zimmerman *et al.* (2012), Mark (2016) hiện tượng heo sốt cao, thở khó, ho, ủ rũ, bỏ ăn, ít đi lại, chảy nước mũi, chảy máu mũi trước khi chết là những biểu hiện đặc trưng của bệnh viêm phổi, màng phổi do vi khuẩn APP. Kết quả khảo sát trong nghiên cứu này cho thấy các triệu chứng ho, chảy dịch mũi, sốt, mắt sưng, bỏ ăn, và ít đi lại là phổ biến nhất (100%). Theo Bossé *et al.* (2002), vi khuẩn APP xâm nhập vào cơ thể vật chủ qua đường hô hấp, chúng tiếp tục đi qua

khí quản và phế quản rồi đến phế nang của phổi. Tại đây, lipopolysaccharide (LPS) và ngoại độc tố của vi khuẩn APP giết chết đại thực bào và bạch cầu trung tính gây nên quá trình viêm. Khi bạch cầu trung tính bị phá hủy sẽ giải phóng lysozymes làm cơ quan hô hấp bị tổn thương trầm trọng. Cơ thể heo tiết ra cytokine có tác dụng ức chế tuần hoàn ở tĩnh mạch để ngăn chặn độc tố phát tán ra khắp cơ thể, gây ra nhồi máu cục bộ ở phổi. Mầm bệnh tấn công ô ạt trong thời gian ngắn và sinh ra các độc tố phá hủy phổi một cách nhanh chóng, kết hợp với hiện tượng ho đẩy máu trong phổi trào ra ngoài nên khi chết heo chảy máu và bọt khí ở mũi, do đó triệu chứng chảy máu mũi/miệng tuy có tần suất xuất hiện thấp (12,50%) nhưng là triệu chứng đặc trưng của bệnh viêm phổi, màng phổi.

3.4 Kết quả định danh các serotype vi khuẩn APP gây bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo tại Bến Tre

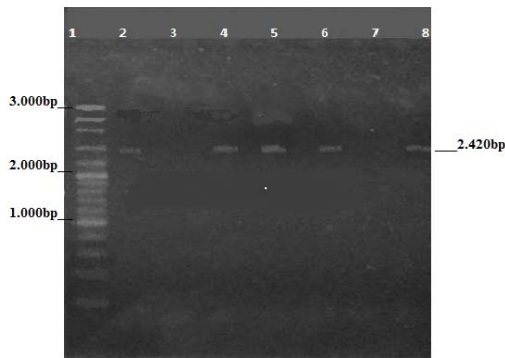
Sự lưu hành của các serotype vi khuẩn APP phổ biến trên heo ở tỉnh Bến Tre cũng được định danh với tỷ lệ khác nhau, kết quả được trình bày tại Bảng 11.

Bảng 11: Kết quả định danh các serotype vi khuẩn APP gây bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo tại Bến Tre (n=16)

Serotype	Số lượng (mẫu)	Tỷ lệ (%)
4	5	31,25
6	1	6,25
9, 11	10	62,50
P=0,003		

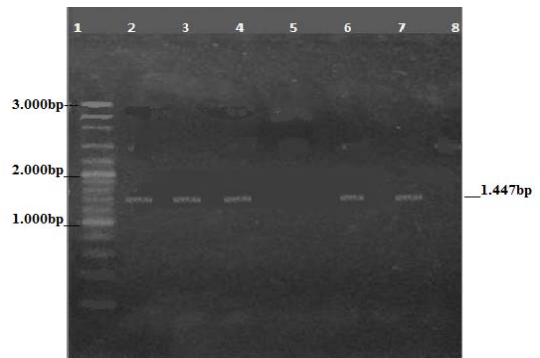
Các serotype 4, 6, 9 và 11 của vi khuẩn APP gây bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo tại tỉnh Bến Tre phân bố khác nhau và sự sai khác này rất có ý nghĩa thống kê (P=0,003). Điều này đã chỉ ra rằng các serotype vi khuẩn APP phân lập được tại tỉnh Bến tre đa dạng và không đồng đều.

Trong các báo cáo nghiên cứu tại Hàn Quốc (Cho *et al.*, 2001), Cộng Hòa Czech (Kucerova *et al.*, 2005), Ontario-Canada (MacInnes *et al.*, 2008) và Thái Lan (Shunsuke *et al.*, 2016), các serotype 4, 6, 9, 11 là những serotype được tìm thấy trong các nguyên nhân gây bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo. Tuy nhiên, báo cáo của Nguyễn Thị Thu Hằng *và ctv.* (2009) nghiên cứu về serotype của vi khuẩn APP tại các tỉnh Miền Bắc và Nguyễn Lương Trường Giang (2015) nghiên cứu tại thành phố Cần Thơ đã cho kết quả các serotype 2, 5 của vi khuẩn APP là phổ biến ở những địa phương này. Từ những kết quả nghiên cứu trên đã cho thấy các serotype của vi khuẩn APP gây bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo xuất hiện ngày càng đa dạng, cần được quan tâm nghiên cứu thường xuyên.



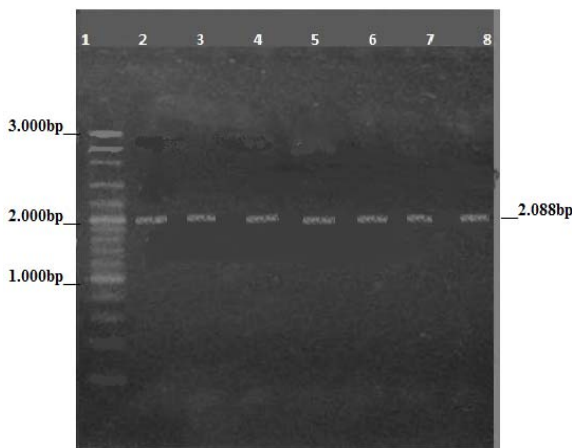
Hình 2: Sản phẩm PCR của gene *apxICA* (2.420bp) của vi khuẩn APP sau quá trình điện di

Giếng 1: Marker (3.000bp); giếng 2: đối chứng dương; giếng 4, 5, 6, 8: dương tính; giếng 3, 7: âm tính.



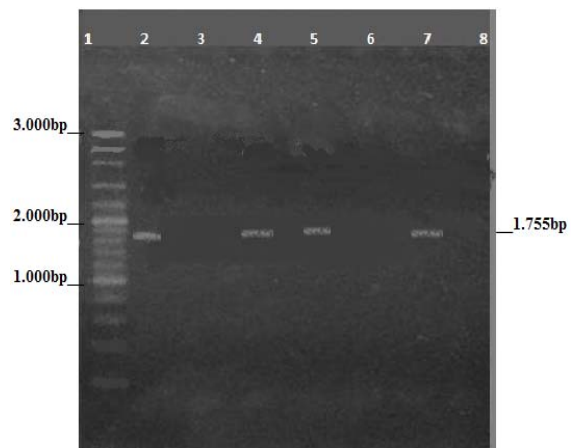
Hình 3: Sản phẩm PCR của gene *apxIBD* (1.447bp) của vi khuẩn APP sau quá trình điện di

Giếng 1: Marker (3.000bp); giếng 2: đối chứng dương; giếng 3, 4, 6, 7: dương tính; giếng 5, 8: âm tính.



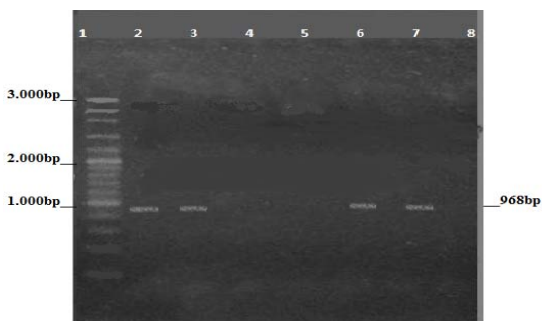
Hình 4: Sản phẩm PCR của gene *apxIICA* (2.088bp) của vi khuẩn APP sau quá trình điện di

Giếng 1: Marker (3.000bp); giếng 2: đối chứng dương; giếng 3, 4, 5, 6, 7, 8: dương tính



Hình 5: Sản phẩm PCR của gene *apxIIICA* (1.755bp) của vi khuẩn APP sau quá trình điện di

Giếng 1: Marker (3.000bp); giếng 2: đối chứng dương; giếng 4, 5, 7: dương tính; giếng 3, 6, 8: âm tính



Hình 6: Sản phẩm PCR của gene *apxIIIBD* (968bp) của vi khuẩn APP sau quá trình điện di

Giếng 1: Marker (3.000bp); giếng 2: đối chứng dương; giếng 3, 6, 7: dương tính; giếng 4, 5, 8: âm tính

3.5 Kết quả kiểm tra sự nhạy cảm với một số loại kháng sinh của vi khuẩn APP phân lập được

Sau khi xác định vi khuẩn APP, tiến hành kiểm tra sự nhạy cảm của vi khuẩn APP với một số loại kháng sinh theo phương pháp khuếch tán trên thạch. Kết quả thể hiện qua Bảng 12.

Qua kết quả kiểm tra cho thấy vi khuẩn APP còn nhạy cảm cao với amoxicillin/clavulanic acid (100%), tulathromycin (81,25%); đề kháng cao với amoxicillin (93,75%), ampicillin (87,50%), tobramycin (87,50%), bactrim (81,25%), streptomycin (75,00%), norfloxacin (68,75%). Đây là các kháng sinh phổ biến dùng để điều trị bệnh cho heo mà người chăn nuôi thường sử dụng. Sự nhạy cảm của vi khuẩn APP với một số loại kháng sinh trong nghiên cứu này cho kết quả tương tự với kết quả báo cáo của Nguyễn Thị Thu Hằng (2010) khi kiểm tra vi khuẩn APP nhạy cảm với

kháng sinh ceftriaxone, ampicillin, amoxicillin tại một số tỉnh phía Bắc và Nguyễn Lương Trường Giang (2015) tại Cần Thơ vi khuẩn APP còn nhạy cảm cao với amoxicillin/clavulanic acid. Nghiên

cứ ở Nhật Bản của Shunsuke *et al.* (2016) cho thấy vi khuẩn APP đề kháng với ampicillin và norfloxacin.

Bảng 12: Kết quả kiểm tra sự nhạy cảm của vi khuẩn APP phân lập được với một số loại kháng sinh (n=16)

TT	Tên kháng sinh	Ký hiệu	Nhạy		Kháng	
			Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)
1	Amoxicillin	Ax	1	6,25	15	93,75
2	Amoxicillin/clav.acid*	Ac	16	100	0	0
3	Ampicillin	Am	2	12,50	14	87,50
4	Bactrim**	Bt	3	18,75	13	81,25
5	Florfenicol	FFC	8	50,00	8	50,00
6	Gentamicin	Ge	11	68,75	5	31,25
7	Neomycin	Ne	7	43,75	9	56,25
8	Norfloxacin	Nr	5	31,25	11	68,75
9	Streptomycin	Sm	4	25,00	12	75,00
10	Tobramycin	Tb	2	12,50	14	87,50
11	Tulathromycin	Tu	13	81,25	3	18,75

*Amoxicillin/clav.acid: amoxicillin/clavulanic acid;

**Bactrim: trimethoprim/Sulfamethoxazole.

Bảng 13: Kết quả kiểm tra tính đa kháng của vi khuẩn APP phân lập được với một số loại kháng sinh (n=16)

Số kháng sinh	Số chủng vi khuẩn đề kháng	Tỷ lệ (%)
4	2	6,25
5	3	6,25
6	2	12,50
7	4	6,25
8	4	6,25
9	1	6,25

Vi khuẩn APP phân lập được đều đa kháng từ 4 đến 9 loại kháng sinh. Sự đa kháng của vi khuẩn APP phân lập được với các loại kháng sinh trong nghiên cứu này cho thấy sự đa kháng là phức tạp và đa dạng. Nguyên nhân có thể là do trong việc

điều trị, các hộ chăn nuôi và cán bộ thú y phối hợp nhiều kháng sinh cùng một lúc sử dụng trong khoảng thời gian dài dẫn đến tình trạng đa kháng. Vì vậy, việc cho kháng sinh vào thức ăn và dùng kháng sinh để điều trị những bệnh trên đường hô hấp của con vật cần phải được quan tâm chú ý.

Kết quả kiểm tra sự đa kháng kháng sinh của 16 chủng vi khuẩn APP cho thấy có sự đa dạng và phức tạp của các serotype, đặc biệt là trong cùng một serotype nhưng lại có nhiều kiểu hình đa kháng khác nhau. Từ đó đặt ra việc nghiên cứu vaccine phòng bệnh phù hợp với các serotype của vi khuẩn APP là điều rất cần thiết, nhất là trong thời điểm vi khuẩn APP ngày càng kháng nhiều loại kháng sinh cùng lúc như hiện nay và việc điều trị bằng kháng sinh đang gặp nhiều khó khăn và kém hiệu quả.

Bảng 14: Kết quả kiểm tra tính đa kháng của các serotype vi khuẩn APP phân lập được với một số loại kháng sinh

Serotype	Số kháng sinh kháng	Kiểu hình đa kháng	Số chủng vi khuẩn đề kháng	Tỷ lệ (%)
4	}	4 Nr + Sm + Tb + Tu	1/5	20
		6 Ax + Am + Bt + Ne + Nr + Tb	1/5	20
		7 Ax + Am + Bt + Ge + Ne + Nr + Tb	1/5	20
		7 Ax + Am + Bt + FFC + Nr + Sm + Tb	1/5	20
		8 Ax + Am + Bt + FFC + Ge + Sm + Tb + Tu	1/5	20
6	5	Ax + Am + Bt + Sm + Tb	1/1	100
9, 11	}	4 Ax + Am + Nr + Sm	1/10	10
		5 Ax + Am + Bt + Ne + Tb	1/10	10
		5 Ax + Am + Nr + Sm + Tb	1/10	10
		6 Ax + Am + Bt + Ne + Nr + Tb	1/10	10
		7 Ax + Am + Bt + FFC + Ne + Sm + Tb	1/10	10
		7 Ax + Am + Bt + FFC + Ne + Nr + Sm	1/10	10
		8 Ax + Bt + FFC + Ge + Ne + Sm + Tb + Tu	1/10	10
		8 Ax + Am + Bt + FFC + Ne + Nr + Sm + Tb	1/10	10
		8 Ax + Am + Bt + FFC + Ge + Nr + Sm + Tb	1/10	10
9 Ax + Am + Bt + FFC + Ge + Ne + Nr + Sm + Tb	1/10	10		

FFC: Florfenicol, Ge: Gentamicin, Bt: Bactrim (Trimethoprim/Sulfamethoxazol), Nr: Norfloxacin, Am: Ampicillin, Ax: Amoxicillin, Ne: Neomycin, Tb: Tobramycin, Tu: Tulathromycin

4 KẾT LUẬN

Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn APP gây bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo tại tỉnh Bến Tre là 24,62%. Vi khuẩn APP hiện diện không phụ thuộc vào lứa tuổi, phương thức nuôi và loại bệnh phẩm. Có 4 serotype vi khuẩn APP gây bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo được định danh tại tỉnh Bến Tre là serotype 4, 6, 9 và 11; trong đó chiếm tỷ lệ cao nhất là serotype 9, 11 (62,50%) và thấp nhất là serotype 6 (6,25%).

Vi khuẩn APP phân lập được nhạy cảm với amoxicillin/clavulanic acid, tulathromycin, gentamicin; đề kháng với amoxicillin, ampicillin, bactim, neomycin, norfloxacin, streptomycin, tobramycin và mang nhiều kiểu hình đa kháng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amanda Lee, 2012. *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. Department of primary industries. <http://www.dpi.nsw.gov.au/factsheets> for updates.

Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., and Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. 45: 493 – 496.

Bossé, J.T., Janson, H., Sheehan, B.J., Beddek, A.J., Rycroft, A.N., Kroll, J.S., and Langford, P.R., 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection*, 4: 225–235.

Brockmeier, S. L., G. Patrick, P. G. Halbur and E. L. Thacker, 2002. Chapter 13: Porcine Respiratory Disease Complex (Editors: Brogden K. A., Guthmiller J. M.). *Polymicrobial Diseases*. ASM Press, Washington (DC): 231–258.

Cục Thống kê tỉnh Bến Tre, 2017. Niên giám thống kê kinh tế, xã hội tỉnh Bến Tre. Số lượng lợn phân theo huyện: 141.

Cho Wan-Seob and C. Chae, 2001. Genotypic prevalence of apxIV in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates. *J Vet Diagn Invest* 13:175–177.

Frey Joachim, 2002. Detection, identification, and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Methods in Molecular Biology*, 216: 87-95.

Ho To, Shinya Nagai, Akira Iwata, Tomohiro Koyama, Atsushi Oshima, and Nobuyuki Tsutsumi, 2016. Genetic and antigenic characteristics of apxIIA and apxIIIA from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3, 4, 6, 8 and 15. *Microbiol Immunol* 2016, 60: 447-458.

Kucerova, Z., Z. Jaglic, R. Ondriasova and K. Nedbalcova, 2005. Serotype distribution of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from porcine pleuropneumonia in the Czech Republic during period 2003-2004. *Vet. Med.*, 50 (8): 355-360.

Lê Văn Dương, Nguyễn Quang Tuyên, Cù Hữu Phú và Hoàng Đăng Huyền, 2012. Kết quả phân lập và xác định một số đặc tính sinh học của các chủng *Actinobacillus pleuropneumoniae* ở heo dương tính với virus rối loạn hô hấp và sinh sản

- tại tỉnh Bắc Giang. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y, 19 (3): 42-47.
- Loera-Muro, A., Francisco J. Avelar-Gozález, Victor M. Loera-Muro, Mario Jacques, and Alma L. Guerrero-Barrera, 2013. Presence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in upper respiratory tract of swine in farms from Aguascalientes, Mexico. Journal of Animal Sciences, 3 (2): 132-137.
- MacInnes, J. I., M. Gottschalk, A. G. Lone, D. S. Metcalf, S. Ojha, T. Rosendal and S. B. Watson, 2008. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. The Canadian Journal of Veterinary Research, 72 (3): 242-248.
- Mark White, 2016. Pig health- *Actinobacillus pleuropneumoniae*. National Animal Disease Information Service (NADIS). <http://www.nadis.org.uk/>
- Mousing, J., S. Jorsal and S. Vibeke, 2006. Disease of respiratory system. Diseases of Swine (9th edition). Straw, B. E., Zimmerman J. J., D'Allaire S., Taylor D. J. (eds). Blackwell Publishing Company, Ames Iowa. 149-170.
- Nguyễn Lương Trường Giang, 2015. Khảo sát sự lưu hành và xác định gene độc lực *apx* của vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* gây bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo tại thành phố Cần Thơ. Hội nghị Khoa học Chăn nuôi-Thú y toàn quốc AVS 2015: 577-583.
- Nguyễn Quốc Huy, Lê Văn Dương, Nguyễn Quang Tuyên, Cù Hữu Phú và Hoàng Đăng Huyền, 2013. Xác định độc lực và khả năng miễn cầm với kháng sinh của các chủng *Actinobacillus pleuropneumoniae* phân lập được từ heo mắc PRRS tại tỉnh Bắc Giang. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y, 20(5): 54-60.
- Nguyễn Thị Thu Hằng, 2010. Nghiên cứu một số đặc tính sinh học và tính sinh miễn dịch của *Actinobacillus pleuropneumoniae* phân lập từ heo làm cơ sở cho việc chế vaccine. Luận văn tiến sĩ Nông nghiệp. Viện thú y – Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.
- Nguyễn Thị Thu Hằng, Đỗ Ngọc Thúy, Cù Hữu Phú, Trương Văn Dung, Âu Xuân Tấn và Lê Thị Minh Hằng, 2009. Ứng dụng kỹ thuật PCR để xác định độc tố (*Apx*) có trong vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* phân lập từ heo bệnh tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y, 16 (4): 51-57.
- Nicole Dron, Rebecca Doyle, Marta Jover-Hernandez, and Trish Holyoake, 2012. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs using pooled oral fluids. Report prepared for the co-operative research centre for high integrity australian pork.
- Pozzi S.P., I. Dolgkew, M. Rabl-Avidor, Y. Hadani, and G.L. Aborali, 2011. Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from Pigs in Israel. Israel Journal of Veterinary Medicine, 66 (2): 29 – 33.
- Quinn, P. J., B. K. Markey, M. E. Carter, W. J. Donnelly and F. C. Leonard, 2004. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Black-Well Science. 131-136.
- Rayamajhi, N., S. J. Shin, S. G. Kang, D. Y. Lee, J. M. Ahn, and H. S. Yoo, 2005. Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on *Apx* toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. J Vet Diagn Invest, 17 (4): 359-362.
- Shunsuke Kamimura, Toshiya Sameshima, and Hiraya Ito, 2016. Serovar and antimicrobial resistance profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in Japan from 2006 to 2011. National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization (Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan).
- Tô Hộ, Iwata Akira và Nagai Shinya, 2014. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: tips huyết thanh, độc lực và chẩn đoán phòng thí nghiệm. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật XXI số 3-2014: 91-97.
- Wendy Mecia Gonzalez, 2016. *Actinobacillus pleuropneumoniae* and the development of an Elisa for the detection of *apxIV* antibody in swine oral fluids. Iowa State University. Paper 14979.