

MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VI KHUẨN *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* CHỦNG PV3952

Võ Thành Thìn, Đặng Văn Tuấn, Lê Đình Hải
Phân viện thú y miền Trung

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm khảo sát một số đặc tính sinh học của chủng *M. hyopneumoniae* PV3952 dùng để sản xuất vaccin phòng bệnh viêm phổi địa phương ở lợn. Bằng các kỹ thuật sinh học phân tử, huyết thanh học và thử nghiệm trên lợn, chúng tôi đã xác định được các đặc tính về di truyền, khả năng thích nghi và phát triển trên môi trường nhân tạo, độc lực của chủng vi khuẩn nghiên cứu và đặc biệt là khả năng gây đáp ứng miễn dịch của chủng vi khuẩn này trên lợn. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng *M. hyopneumoniae* PV3952 có đặc điểm về di truyền giống với các chủng *M. hyopneumoniae* khác đã phân lập được ở nước ta. Chủng vi khuẩn PV3952 có khả năng thích nghi tốt trên môi trường Friis và ổn định ở đời cấy chuyển thứ 5 trở đi. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, chủng vi khuẩn này có độc lực cao đối với lợn thí nghiệm và tính độc của nó không thay đổi sau nhiều đời nuôi cấy trên môi trường thí nghiệm. Ngoài ra, chủng vi khuẩn này có khả năng gây đáp ứng miễn dịch, bảo hộ mạnh và ổn định trên lợn.

Từ khóa: lợn, *M. hyopneumoniae*, đặc tính sinh học, PCR.

Some biological features of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain - PV3952

Vo Thanh Thin, Dang Van Tuan, Le Dinh Hai

SUMMARY

The objective of this study aimed at investigating some biological features of the *M. hyopneumoniae* strain - PV3952 so as to use for vaccine development against the pneumonia in pigs. The genetic features, adaptable ability and growth on Friis medium, the pathogenicity as well as ability to induce immune response in pigs of the *M. hyopneumoniae* strain - PV3952 were detected, by using molecular techniques, serological test and experimental infection in pigs. The studied results showed that the genetic features of *M. hyopneumoniae* strain - PV3952 were similar to those of other *M. hyopneumoniae* strains isolated in Viet Nam. This bacteria also adapted and grew well on the Friis medium and stability from the 5th generation onwards. The result of pathogenic tests showed that, the *M. hyopneumoniae* strain - PV3952 was highly virulent bacteria strain in the experimental pigs, and its pathogenicity was not changed through many passage inoculation generations on Friis medium. Moreover, the *M. hyopneumoniae* strain - PV3952 was able to induce strongly immune response against porcine pneumonia.

Keywords: pig, *M. hyopneumoniae*, biological features, PCR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mycoplasma hyopneumoniae (*M. hyopneumoniae*) là nguyên nhân gây bệnh viêm phổi địa phương ở lợn (enzootic porcine pneumonia) trên toàn thế giới với tỷ lệ mắc bệnh cao, gây thiệt hại kinh tế lớn cho tất cả các nước chăn nuôi lợn trên thế giới. Bệnh viêm phổi do *M. hyopneumoniae* làm giảm khả năng tăng trọng, giảm hiệu suất

chuyển hóa thức ăn, tăng chi phí điều trị bệnh (Clark và cs., 1991). Bệnh không gây ra tỷ lệ chết cao, tuy nhiên nó làm tăng nguy cơ mắc các bệnh truyền nhiễm cơ hội khác như bệnh do *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* và các loại virus như cúm lợn (swine influenza) hoặc virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS) (Sorensen và cs., 1997). Sự bám dính của *M. hyopneumoniae* vào các tế bào lông nhung

trên đường hô hấp mở mang quá trình xâm nhập, phá hoại và làm mất các tế bào lông nhung. Sự mất đi các tế bào có chức năng chuyên biệt tiết chất nhầy dẫn đến việc giảm mạnh cơ chế phòng vệ không đặc hiệu màng nhầy đối với các tác nhân khác, do đó làm tăng nguy cơ nhiễm trùng của vật chủ với các tác nhân vi khuẩn, virus gây bệnh thứ phát (Blanchard và cs., 1992; DeBey và Ross, 1994). Do đó, không chế vi khuẩn *M. hyopneumoniae* là biện pháp đặc biệt quan trọng nhằm làm giảm tỷ lệ lợn mắc bệnh, ngăn ngừa sự bội nhiễm của các tác nhân thứ phát, qua đó làm tăng hiệu quả kinh tế cho người chăn nuôi. Phòng bệnh viêm phổi địa phương ở lợn bao gồm nhiều biện pháp như quản lý chất lượng đàn lợn, cải thiện môi trường chuồng nuôi, sử dụng kháng sinh (Maes và cs., 2008). Tuy nhiên, tiêm vaccin để phòng bệnh cho lợn, tăng đề kháng với *M. hyopneumoniae* là quan trọng nhất và được khuyến cáo rộng rãi cho người chăn nuôi (Okamba và cs., 2007; Jeong và cs., 2016; Park và cs., 2016).

Ở nước ta, bệnh viêm phổi địa phương đã được mô tả từ những năm 1950 (Nguyễn Ngọc Nhiên, 1997). Từ đó đến nay, đã có một số tác giả nghiên cứu về bệnh này (Nguyễn Thị Phước Ninh và cs., 2008; Lê Văn Lãnh và cs., 2012). Kết quả khảo sát gần đây nhất của Đặng Văn Tuấn và cs. (2016) cho thấy, tỷ lệ lợn bị nhiễm vi khuẩn *M. hyopneumoniae* ở nước ta khá cao, xấp xỉ 70% đối với lợn thịt. Một số chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* cũng đã được phân lập trên các mẫu bệnh phẩm phổi lợn thu thập tại nhiều

vùng khác nhau ở Việt Nam (Võ Thành Thìn và cs., 2016). Một trong các chủng đó là chủng *M. hyopneumoniae* PV3952 được chúng tôi lựa chọn trong nghiên cứu này để tiến hành khảo sát tất cả các đặc điểm sinh học của nó nhằm lựa chọn làm chủng sản xuất vacxin phòng bệnh.

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

2.1. Nội dung

- Nghiên cứu xác định đặc tính di truyền của chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952 và xác định các gen *p36*, *p46*, *p65* và *p97* mã hóa các yếu tố độc lực của nó.

- Nghiên cứu khả năng thích nghi và phát triển của chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952 trên môi trường Friis.

- Nghiên cứu độc lực của chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952 trên lợn.

- Nghiên cứu khả năng gây đáp ứng miễn dịch của chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952 trên lợn.

2.2. Nguyên liệu

- Chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952 phân lập từ mẫu bệnh phẩm phổi lợn

- Lợn con 3 - 4 tuần tuổi khỏe mạnh, không có kháng thể kháng *M. hyopneumoniae*.

Bảng 1. Primer phát hiện các gen *p36*, *p46*, *p65*, *p97* và *16S rRNA*

Trình tự primers	Gen	Sản phẩm PCR (bp)	Nguồn
F- 5'-GCGGGAAGACCACAAAAACC-3'	p36	423	Nghiên cứu này
R-5'-TTCATAAGCCCGGCGAGAAA-3'			
F-5'-GCAGCAGGTTGTGGACAGAC-3'	p46	660	Caron và cs. (2000)
R-5'-CAGCATTTTCGCCTTCAGGAG-3'			
F-5'-GCACTAGGCGATTCGCTAAC-3'	p65	503	Nghiên cứu này
R-5'-TCTGCCAGGAAATTCGCTCTT-3'			
F-5'-GGAAATTATGCCTATGAATTCG-3'	p97	318	Adams và cs. (2005)
R-5'-GTGCTCTGTTAGTTTCTAGTCC-3'			
F-5'-TTG ATC CTG GCT CAG G-3'	16S rRNA	900	Pettersson và cs. (1996)
R- 5'-CTT GTG CGG GYY CCC GTC AAT TC-3'			

- Môi trường, hóa chất nuôi cấy vi khuẩn *M. hyopneumoniae*.

- Kit chiết tách DNA, enzyme và hóa chất, sinh phẩm khác cho các phản ứng PCR.

- Kit ELISA IDEXX *M. hyo.* (Mỹ) kiểm tra kháng thể kháng *M. hyopneumoniae*.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp xác định đặc tính di truyền của chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952

- Đặc tính di truyền của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp giải trình tự gen *16S rRNA* sử dụng cặp mồi của Pettersson và cs. (1996) và xây dựng cây phả hệ bằng phần mềm BioEdit và DNASTAR (bảng 1).

- Xác định các gen mã hóa các yếu tố độc lực của *M. hyopneumoniae* *p46* theo Caron và cs. (2000) và *p97* theo Adams và cs. (2005). Các cặp mồi phát hiện gen *p65* và *p36* do chúng tôi tự thiết kế sử dụng phần mềm Primer-BLAST trên NCBI (bảng 1). Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1,5% có bổ sung ethidium bromide.

2.3.2. Phương pháp xác định khả năng thích nghi và phát triển trên môi trường nhân tạo của chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952

Chúng tôi dùng phương pháp cấy chuyển chủng *M. hyopneumoniae* PV3952 trên môi trường Friis 20 đời liên tiếp. Đếm số lượng vi khuẩn ở các đời cấy chuyển Pass 1, Pass 5, Pass 10, Pass 15 và Pass 20 bằng phương pháp xác định chỉ số CCU/ml.

2.3.3. Phương pháp xác định độc lực của chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952

Độc lực của chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952 được xác định theo Opriessnig và cs. (2004) và Kristensen và cs. (2014). Chủng *M. hyopneumoniae* được nuôi

trên môi trường Friis để đạt số lượng 10^7 CCU/ml (CCU: color changing unit) gây nhiễm cho 3 lợn với liều 5×10^7 CCU/con (5ml canh khuẩn) bằng đường tiêm trực tiếp vào khí quản, gây nhiễm lần thứ 2 sau 24 giờ. Lợn đối chứng (2 con) được tiêm 5ml môi trường Friis/con, lặp lại sau 24 giờ. Tất cả lợn được theo dõi đến 28 ngày sau gây nhiễm.

2.3.4. Phương pháp xác định đặc tính gây miễn dịch của chủng *M. hyopneumoniae* PV3952

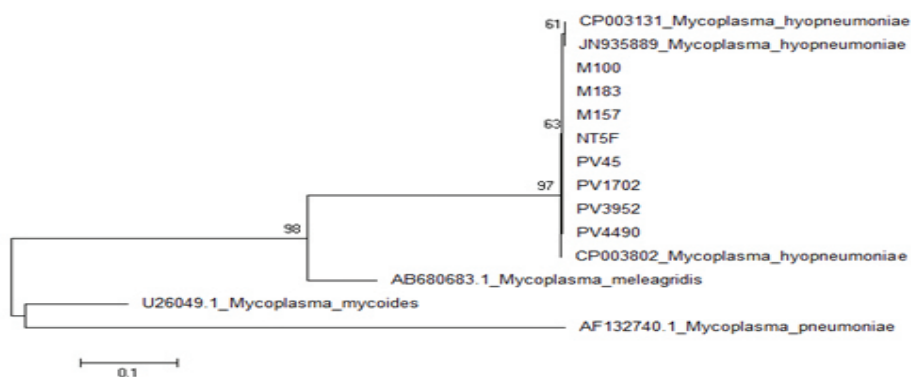
Đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch của vi khuẩn MH trên lợn bằng cách gây miễn dịch cho lợn với các liều vi khuẩn MH đã bất hoạt bằng formalin. Sử dụng 4 liều khác nhau để miễn dịch cho lợn là $0,5 \times 10^8$ CCU/ con/ tiêm dưới da, 1×10^8 CCU/ con/ tiêm dưới da, 2×10^8 CCU/ con/ tiêm dưới da và 4×10^8 CCU/ con/ tiêm dưới da (sử dụng kháng nguyên pha loãng theo cơ số 2). Mỗi liều tiêm cho 3 lợn, nhắc lại sau 14 ngày. Đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch của vi khuẩn MH thông qua phát hiện kháng thể kháng MH trong huyết thanh lợn lúc 14 ngày và 28 ngày sau tiêm miễn dịch bằng phản ứng ELISA, sử dụng bộ kit IDEXX *M. hyo.* Ab Test – Mỹ. Tất cả lợn miễn dịch và đối chứng được thử thách cường độc với chủng vi khuẩn MH PV3952 vào ngày thứ 28 (phương pháp thực hiện như kiểm tra độc lực vi khuẩn).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đặc tính di truyền của vi khuẩn *M. hyopneumoniae* chủng PV3952

Chúng tôi đã tiến hành giải trình tự đoạn gen *16s rRNA* có kích thước 852 bp nằm trong vùng U1 (10 - 34) đến vùng U5 (924 - 902) của *rrnA* và *rrnB* operon của vi khuẩn *M. hyopneumoniae* chủng PV3952 (mã số ngân hàng gen KY575149). Kết quả cho thấy trình tự nucleotic trên gen *16s rRNA* của chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952 tương đồng với các chủng khác phân lập được tại Việt Nam và trên thế giới (hình 1).

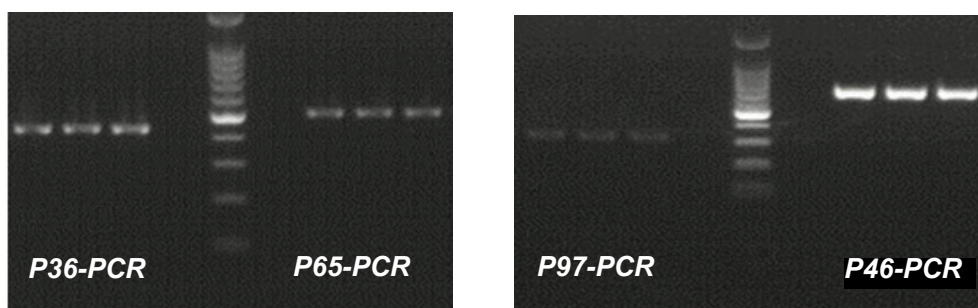
1 CGCTAAAATA TTTAGTAGCA AATGGGTGAG TAACACGTAC CTAACCTACC TTTTGGACTG
 61 GGATAACCAT TGGAAACAGT GGCTAATACC GGATATGATA AAAATTTGCA TGAATTTTAA
 121 TTCAAAGGAG CTTTCAAGCT TCACCAAGAA ATGGGGGTGC GCAACATTAG TTAGTTGGTA
 181 GGGTAAAAGC CTACCAAGAC GATGATGTTT AGCGGGGCCA AGAGGTTGTA CCGCCACACT
 241 GGGATTGAGA TACGGCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TAAGGAATAT TCCACAATAA
 301 GCGAAAGCTT GATGGAGCGA CACAGCGTGC AGGATGAAGT CTTTCGGGAT GTAAACTGCT
 361 GTTGTAAAGG AAGAAAAAAC TAGATAGGAA ATGCTCTAGT CTTGACGGTA CCTTATTAGA
 421 AAGCGACGGC AAACATATGT CCAGCAGCCG CGGTAATACA TAGGTCGCAA GCGTTATCCG
 481 GAATTATTGG GCGTAAAGCG TCCGTAGGTT TTTTGTTAAG TTAAAGTTA AATGCTAAAG
 541 CTCAACTTTA GTCCGCTTTA GATACTGGCA AAATAGAATT ATGAAGAGGT TAGCGGAATT
 601 CCTAGTGGAG TGGTGGAATA CGTAGATATT AGGAAGAACA CCAATAGGCG AAGGCAGCTA
 661 ACTGGTCATA TATTGACACT AAGGGACGAA AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC
 721 TGGTAGTCCA CGCCGTAAAC GATGATCATT AGTTGGTGGC AAAAGTCACT AACACAGCTA
 781 ACGCGTTAAA TGATCCGCCT GAGTAGTATG CTCGCAAGAG TGAAA./



Hình 1. Cây phả hệ xác định mối quan hệ của chủng MH PV3952 dựa vào trình tự nucleotide trên gen 16s rRNA

Ngoài ra, kết quả kiểm tra các gen mã hóa 4 quyết định kháng nguyên chính là P36, P46, P65 và P97 của chủng *M. hyopneumoniae* PV3952 cũng cho thấy, chủng vi khuẩn này

mang đầy đủ cả 4 gen trên. Khi điện di sản phẩm PCR trên agarose sẽ cho các vạch có kích thước lần lượt là 423bp, 660bp, 503bp và 318bp (hình 2).



Hình 2. Kết quả PCR xác định gen mã hóa kháng nguyên của *M. hyopneumoniae* PV3952 (giếng 1, 2, 8, 9, 10, 11, 17, 18: mẫu DNA chủng MH PV3952; giếng 3, 7, 12, 16: mẫu DNA đối chứng dương; giếng 4, 6, 13, 15: đối chứng âm; giếng 5, 14: thang chuẩn DNA 100bp)

Vi khuẩn *M. hyopneumoniae* có khả năng tổng hợp một số protein quyết định tính kháng nguyên của nó, trong đó P36, P46, P65 và P97 là đáng chú ý nhất (Zhang và cs., 1995, Caron và cs., 2000). Sau khi xâm nhập vào cơ thể lợn qua đường hô hấp, vi khuẩn *M. hyopneumoniae* bám dính vào lớp lông rung trên đường hô hấp và xâm thực bề mặt lớp tế bào biểu mô lông rung trên khí quản, phế quản, tiểu phế quản (Kwon và cs., 2002). Quá trình bám dính này nhờ vào yếu tố độc lực là các carbohydrates và protein như P97 trên bề mặt tế bào vi khuẩn *M. hyopneumoniae* (Li và cs., 2009). Kháng nguyên P97 là một protein màng, đóng vai trò quan trọng nhất trong cơ chế gây bệnh của *M. hyopneumoniae*, giúp vi khuẩn bám vào các tế bào lông rung niêm mạc đường hô hấp của lợn để gây bệnh. Tính gây bệnh mang đặc trưng loài của *M. hyopneumoniae* là nhờ kháng nguyên P97. Kháng nguyên này chỉ bám dính đặc hiệu vào niêm mạc đường hô hấp của lợn mà không phải niêm mạc của các loài vật chủ khác (Hsu và cs., 1997). Kháng nguyên P36 là một protein có trọng lượng phân tử 36 kDa được mã hóa bởi gen *L-lactate dehydrogenase* có kích thước 942 bp của vi khuẩn *M. hyopneumoniae*. Đây là một trong những protein có tính kháng nguyên cao, có khả năng gây đáp ứng miễn dịch nhanh và mạnh ở lợn nhiễm bệnh tự nhiên cũng như lợn gây nhiễm thực nghiệm. P36 là một kháng nguyên đặc trưng chỉ duy

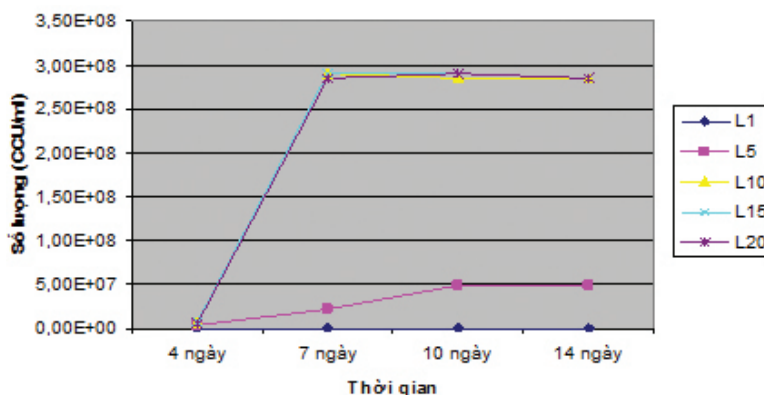
nhất có ở các loài *M. hyopneumoniae*, trong khi đó ở các loài *Mycoplasma* khác không có kháng nguyên này. Do đó kháng thể kháng protein P36 có thể được dùng để phát hiện các chủng *M. hyopneumoniae* (Stipkovits et al., 1991). Kháng nguyên P46 được mã hóa bởi gen có kích thước 1260bp, trong khi đó kháng nguyên P65 được mã hóa bởi gen có kích thước 1803bp. Đây là hai protein bề mặt của *M. hyopneumoniae*. Những protein này có tính kháng nguyên cao, có khả năng gây đáp ứng miễn dịch sớm và đặc hiệu ở lợn con cai sữa và lợn trưởng thành khi nhiễm cấp tính hoặc ở giai đoạn đầu nhiễm *M. hyopneumoniae* (Hsu và cs., 1997).

3.2. Khả năng thích nghi và phát triển trên môi trường Friis của chủng *M. hyopneumoniae* PV3952

Chúng tôi đã cấy chuyển chủng *M. hyopneumoniae* PV3952 trên môi trường Friis 20 đời liên tiếp. Lấy mẫu ở các đời cấy chuyển Pass 1, Pass 5, Pass 10, Pass 15, Pass 20 để kiểm tra khả năng thích nghi và phát triển của vi khuẩn thông qua giá trị CCU/ml. Kết quả cho thấy vi khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952 thích nghi tốt trên môi trường Friis. Vi khuẩn bắt đầu phát triển nhanh sau 5 lần cấy chuyển và phát triển ổn định từ đời thứ 10 trở đi. Vi khuẩn phát triển mạnh và ổn định sau 7 ngày, số lượng đạt tối thiểu $2,84 \times 10^8$ CCU/ml (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả theo dõi sự phát triển của *M. hyopneumoniae* PV3952 trên môi trường Friis

TT	Lần cấy chuyển	Thời gian theo dõi			
		4 ngày	7 ngày	10 ngày	14 ngày
1	Pass 1	$1,39 \times 10^4$	$1,60 \times 10^4$	$2,87 \times 10^4$	$2,55 \times 10^4$
2	Pass 5	$3,62 \times 10^6$	$2,10 \times 10^7$	$4,84 \times 10^7$	$4,90 \times 10^7$
3	Pass 10	$7,90 \times 10^6$	$2,90 \times 10^8$	$2,84 \times 10^8$	$2,84 \times 10^8$
4	Pass 15	$7,74 \times 10^6$	$2,90 \times 10^8$	$2,90 \times 10^8$	$2,82 \times 10^8$
5	Pass 20	$5,22 \times 10^6$	$2,84 \times 10^8$	$2,90 \times 10^8$	$2,88 \times 10^8$



Hình 3. Khả năng phát triển của chủng MH PV3952 trên môi trường Friis

3.3. Kết quả xác định độc lực của vi khuẩn *M. hyopneumoniae* chủng PV3952

Độc lực trên lợn của chủng *M. hyopneumoniae* PV3952 được xác định bằng cách gây nhiễm cho lợn cai sữa (7 - 10 kg). Lợn thí nghiệm được lựa chọn từ những trại chưa có tiền sử về bệnh viêm phổi do *M. hyopneumoniae*, không có kháng thể kháng *M. hyopneumoniae*. Canh khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952 trên môi trường Friis ở 37°C/ 7 – 10 ngày để đạt số lượng 10^7 CCU/ml được sử dụng để gây nhiễm cho 3 lợn với liều 5×10^7 CCU/con (5ml canh khuẩn) bằng đường tiêm trực tiếp vào khí quản, gây nhiễm lần thứ 2 sau 24 giờ. Lợn đối chứng (2 con) được tiêm 5ml môi trường Friis/con, lặp lại sau 24 giờ. Tất

cả lợn được theo dõi đến 28 ngày sau gây nhiễm.

Hàng ngày, theo dõi các biểu hiện lâm sàng trên lợn và chấm điểm: hắt hơi (0 điểm: không hắt hơi, 1 điểm: thỉnh thoảng có hắt hơi, 2 điểm: hắt hơi theo từng cơn, 3 điểm: hắt hơi dai dẳng, kéo dài); ho (0 điểm: không ho, 1 điểm: thỉnh thoảng có ho, ho từng tiếng, 2 điểm: ho nhiều theo từng cơn, 3 điểm: ho dai dẳng, kéo dài). Sau 28 ngày gây nhiễm, tiến hành mổ khám để đánh giá bệnh tích đại thể và lấy mẫu xét nghiệm vi thể. Điểm số được đánh giá riêng trên từng lợn thí nghiệm, sau đó tính giá trị trung bình. Kết quả đánh giá độc lực các chủng được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độc lực của các chủng *M. hyopneumoniae* PV3952 trên lợn

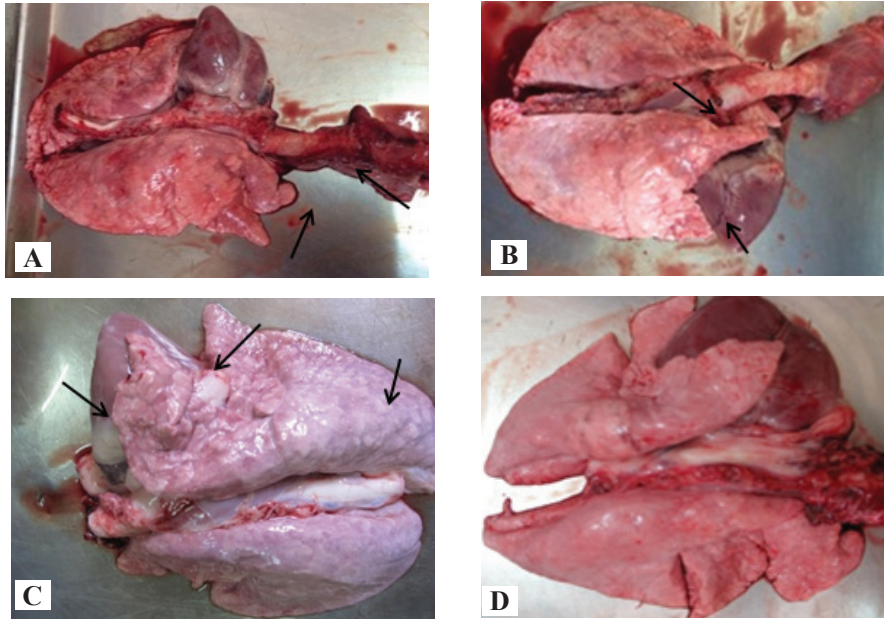
Lợn thí nghiệm	Biểu hiện lâm sàng		Bệnh tích đại thể (% thể tích phổi viêm)	Real-time PCR
	Hắt hơi	Ho		
Lợn thí nghiệm 1	1,00	1,33	26	+
Lợn thí nghiệm 2	1,10	1,00	24	+
Lợn thí nghiệm 3	1,30	0,96	25	+
Lợn đối chứng 1	0,00	0,00	2	-
Lợn đối chứng 2	0,00	0,00	0	-

Như vậy, chủng *M. hyopneumoniae* PV3952 có độc lực cao trên lợn. Qua theo dõi 28 ngày sau khi gây nhiễm cho thấy, có sự khác biệt giữa nhóm lợn thí nghiệm và lợn đối chứng. Vi khuẩn có khả năng gây một số triệu chứng lâm sàng của bệnh viêm phổi ở lợn như

ho, hắt hơi ở tất cả các lợn gây nhiễm. Ngược lại, ở nhóm lợn đối chứng, lợn không thể hiện triệu chứng bệnh viêm phổi, lợn phát triển bình thường (bảng 1). Bệnh tích đại thể ở lợn gây nhiễm bằng chủng *M. hyopneumoniae* PV3952 có biểu hiện rất đặc trưng. Phổi lợn

có biểu hiện từ đỏ đến sẫm màu, nhục hóa. Các tổn thương ở phổi xuất hiện ở thùy đỉnh, thùy tim và thùy giữa (Hình 4 A, B, C); tỷ lệ

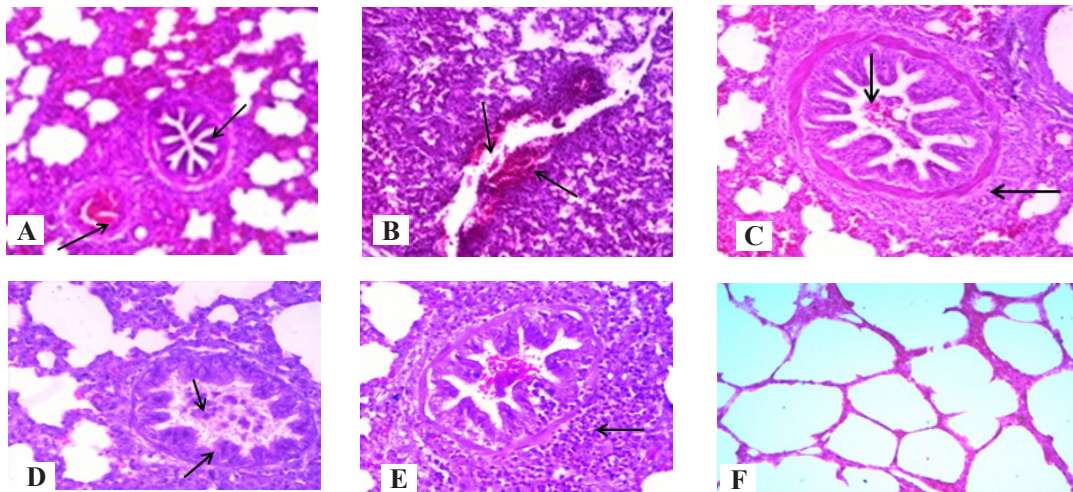
thể tích phổi viêm trên 24 - 26% (bảng 3). Trong khi đó phổi lợn đối chứng không bị tổn thương (hình 4D).



Hình 4. Bệnh tích đại thể trên phổi lợn gây nhiễm *M. hyopneumoniae* PV3952

Phân tích các bệnh tích vi thể cũng cho thấy trong khi phổi lợn đối chứng có phế nang mỏng, lòng phế nang rộng và trong sáng (hình 5F) thì ở lợn thí nghiệm, phổi sung huyết, mao quản ở vách phế nang dẫn rộng, chứa đầy hồng cầu bất

màu đỏ rõ, lòng phế nang bị thu hẹp. Viêm kẽ phổi, vùng vách ngăn giữa các tiểu thùy phổi dẫn rộng do tăng sinh tế bào viêm. Vách phế quản nhão, lòng phế quản hẹp và có chứa hồng cầu (hình 5A, B, C, D, E).



Hình 5. Bệnh tích đại thể trên phổi lợn gây nhiễm *M. hyopneumoniae* PV3952

Chúng tôi cũng tiến hành kiểm tra độc lực của chủng vi khuẩn ở các đời cấy chuyển. Phương pháp gây nhiễm được tiến hành như đã mô tả ở trên. Mỗi đời cấy chuyển chủng, chúng tôi gây nhiễm cho 3 lợn. Kết quả cho thấy, ở

tất cả các đời cấy chuyển, độc lực của chủng vi khuẩn không thay đổi. Chủng vi khuẩn ở tất cả các đời cấy chuyển đều có thể gây ra các triệu chứng lâm sàng và bệnh tích đặc trưng của bệnh viêm phổi địa phương (bảng 4).

Bảng 4. Độc lực của chủng *M. hyopneumoniae* PV3952 sau các lần cấy chuyển trên lợn

Lần cấy chuyển	Số lợn gây nhiễm (con)	PV3952			
		Triệu chứng lâm sàng		Bệnh tích đại thể	
		Có	Không	Có	Không
Pass 1	3	√		√	
Pass 5	3	√		√	
Pass 10	3	√		√	
Pass 15	3	√		√	
Pass 20	3	√		√	
Đối chứng	2		√		√

3.4. Kết quả xác định tính gây miễn dịch của chủng *M. hyopneumoniae* PV3952

Đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch của

vi khuẩn MH trên lợn bằng cách gây miễn dịch cho lợn với các liều vi khuẩn MH đã bất hoạt bằng formalin (pha loãng kháng nguyên theo cơ số 2). Kết quả thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả xác định liều miễn dịch của MH trên lợn

Chủng MH	Số lợn thí nghiệm (con)	Liều miễn dịch (CCU / con)		Kết quả ELISA		Thử thách cường độ		
		Lần 1	Lần 2	14 ngày	28 ngày	Triệu chứng	Bệnh tích đại thể	Bệnh tích vi thể
PV3952	3	0,5 x 10 ⁸	0,5 x 10 ⁸	-	-	Có	Có	Có
	3	1 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸	-	-	Có	Có	Có
	3	2 x 10 ⁸	2 x 10 ⁸	-	+	Không	Không	Không
	3	4 x 10 ⁸	4 x 10 ⁸	-	+	Không	Không	Không
Đối chứng	2	Không tiêm	Không tiêm	-	-	Có	Có	Có

(-): âm tính với kháng thể kháng MH

(+): dương tính với kháng thể kháng MH

Kết quả bảng 5 cho thấy, 14 ngày sau mũi tiêm miễn dịch thứ nhất, không có lợn nào dương tính với kháng thể kháng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* ở cả 4 liều tiêm. Tuy nhiên, 14 ngày sau mũi tiêm miễn dịch thứ 2, những lợn được gây miễn dịch với liều 2 x 10⁸ và 4 x 10⁸ CCU/ con đều cho kết quả dương tính. Trong khi đó với liều tiêm 0,5 x 10⁸ CCU/ con và 1 x 10⁸ CCU/ con, cả 2 chủng đều không gây

được đáp ứng miễn dịch sau 2 mũi tiêm. Lợn đối chứng âm tính với kháng thể kháng vi khuẩn *M. hyopneumoniae*. Như vậy, chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952 vô hoạt có thể gây đáp ứng miễn dịch trên lợn thí nghiệm với liều tối thiểu 2 x 10⁸ CCU/con, nhắc lại sau 14 ngày. Liều miễn dịch này sẽ được sử dụng để đánh giá tính ổn định khả năng gây đáp ứng miễn dịch của chủng MH và là cơ sở để xây dựng liều

vacxin trong các nghiên cứu tiếp theo.

Ngoài ra, chúng tôi cũng tiến hành kiểm tra khả năng gây đáp ứng miễn dịch của chủng vi khuẩn ở các đời cây chuyển Pass 1, Pass 5, Pass 10, Pass 15 và Pass 20. Phương pháp được tiến hành như đã

mô tả ở mục 3.1. Ở mỗi đời cây chuyển, chúng tôi tiêm miễn dịch cho 3 lợn. Kết quả cho thấy, tất cả các lợn được tiêm miễn dịch bằng chủng vi khuẩn ở các đời cây chuyển khác nhau đều dương tính với kháng thể kháng *M. hyopneumoniae* (bảng 6).

Bảng 6. Kết quả đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch của chủng *M. hyopneumoniae* PV3952 sau các lần cấy chuyển trên lợn

Đời cây chuyển	Số lợn thí nghiệm (con)	Kết quả ELISA
Pass 1	3	+ (3/3)
Pass 5	3	+ (3/3)
Pass 10	3	+ (3/3)
Pass 15	3	+ (3/3)
Pass 20	3	+ (3/3)
Đối chứng	2	- (2/2)

(+): dương tính

IV. KẾT LUẬN

- Trình tự nucleotid trên gen *16S rRNA* của chủng *M. hyopneumoniae* PV3952 tương đồng với các chủng *M. hyopneumoniae* khác phân lập tại Việt Nam và mang đầy đủ gen mã hóa các yếu tố độc lực P36, P46, P65 và P97.

- Chủng *M. hyopneumoniae* PV3952 có khả năng thích nghi, phát triển tốt trên môi trường Friis và ổn định ở đời cây chuyển thứ 5.

- Chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952 có độc lực cao và ổn định khi cấy chuyển nhiều đời trên môi trường nhân tạo.

- Chủng vi khuẩn *M. hyopneumoniae* PV3952 có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt và ổn định trên lợn, có thể dùng để làm giống sản xuất vacxin phòng bệnh viêm phổi ở lợn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Văn Lãnh, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Trịnh Đình Thái, Đặng Hữu Anh, Đỗ Ngọc Thủy, Nguyễn Bá Hiên. 2012. Một số đặc điểm dịch tễ học bệnh suyễn lợn và ứng dụng kỹ thuật semi-nested PCR xác định *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, XIX (2): 13-20.
2. Nguyễn Ngọc Nhiên, 1997. Bài giảng Hội chứng bệnh đường hô hấp do *Mycoplasma* khởi phát, dùng cho lớp sau đại học thú y - Viện Thú y quốc gia.
3. Nguyễn Thị Phước Ninh, Nguyễn Ngọc Tuấn, Trần Thị Dân, Nguyễn Thị Bạch Tuyết, 2008. Kháng thể mẹ truyền chống *Mycoplasma hyopneumoniae* và tăng trưởng ở heo con từ sơ sinh đến 60 ngày tuổi. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, 15(1), 26-32.
4. Võ Thành Thìn, Đặng Văn Tuấn, Lê Đình Hải. 2016. Phân lập và định danh vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumoniae* từ mẫu bệnh phẩm lợn. *Tạp chí Khoa học công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, 8(69), 84-88.
5. Đặng Văn Tuấn, Lê Đình Hải, Vũ Khắc Hùng, Võ Thành Thìn, 2016. Khảo sát kháng thể kháng *Mycoplasma hyopneumoniae* trên lợn nuôi tại một số tỉnh Nam Trung bộ và Tây Nguyên. *Tạp chí khoa học công nghệ nông nghiệp Việt Nam*. 6 (67), 44-47.
6. Adams, C., Pitzer J. & Minion, F. C. 2005. *In vivo* expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun*, 73, 7784-7.
7. Blanchard, B., Vena, M. M., Cavalier, A.,

- Lannic, J. L., Gouranton, J. & Cobisch, M. 1992. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, 30, 329-341.
8. Caron, J., Ouardani, M. & Dea, S. 2000. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J Clin Microbiol*, 38, 1390-6.
 9. Clark, L., Armstrong, C., Freeman, M., Scheidt, A., Sands-Freeman, L. & Knox, K. 1991. Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumonia. *Veterinary medicine (USA)*.
 10. Debey, M. C. & Ross, R. F. 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infection and Immunity*, 62, 5312-5318.
 11. Hsu, T., Artiushin, S. & Minion, F. C. 1997. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Bacteriol*, 179, 1317-23.
 12. Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., & Haesebrouck, F. (2008). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology*, 126(4), 297-309. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.09.008>
 13. Jeong, J., Park, C., Choi, K., & Chae, C. (2016). A new single-dose bivalent vaccine of porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* elicits protective immunity and improves growth performance under field conditions. *Veterinary Microbiology*, 182, 178-186. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.11.023>
 14. Kristensen, C. S., Vinther, J., Svensmark, B. & Baekbo, P. 2014. A field evaluation of two vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Acta Vet Scand*, 56, 24.
 15. Kwon, D., Choi, C. & Chae, C. 2002. Chronologic Localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Experimentally Infected Pigs. *Veterinary Pathology Online*, 39, 584-587.
 16. Li, Y. Z., Ho, Y. P., Chen, S. T., Chiou, T. W., Li, Z. S. & Shiuan, D. 2009. Proteomic comparative analysis of pathogenic strain 232 and avirulent strain J of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biochemistry (Mosc)*, 74, 215-20.
 17. Opriessnig, T., THacker, E. L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X. J. & Halbur, P. G. 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol*, 41, 624-40.
 18. Pettersson, B., Leitner, T., Ronaghi, M., Bolske, G., Uhlen, M. & Johansson, K. E. 1996. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. *Journal of Bacteriology*, 178, 4131-42
 19. Simionatto, S., Marchioro, S. B., Maes, D. & Dellagostin, O. A., 2013. *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. *Vet Microbiol*, 165, 234-42.
 20. Sorensen, V., Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, A. A., Feld, N. C., Friis, N. F., Bille-Hansen, V., Jensen, N. E. & Pedersen, M. W., 1997. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Veterinary Microbiology*, 54, 23-34.
 21. Stipkovits, L., Nicolet, J., Haldimann, A. & Frey, J. 1991. Use of antibodies against the P36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* for the identification of *M. hyopneumoniae* strains. *Mol Cell Probes*, 5, 451-7.
 22. Zhang, Q., Young, T. F. & Ross, R. F. 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infection and Immunity*, 63, 1013-9.

Ngày nhận 10-2-2018

Ngày phản biện 23-6-2018

Ngày đăng 1-9-2018