

PHÂN LẬP VI KHUẨN *RIEMERELLA ANATIPES* TỪ MẪU BỆNH PHẨM VỊT CÓ TRIỆU CHỨNG NGHI MẮC BỆNH NHIỄM TRÙNG HUYẾT

Võ Thành Thìn, Đặng Văn Tuấn, Lê Đình Hải

Phân viện thú y miền Trung

TÓM TẮT

Đã tiến hành phân lập và định danh vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* (RA) từ bệnh phẩm của 408 con vịt ở các độ tuổi khác nhau có triệu chứng bệnh nhiễm trùng huyết. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ vịt bị mắc bệnh nhiễm trùng huyết do vi khuẩn RA gây ra trung bình là 35,04%. Tỷ lệ vịt nhiễm vi khuẩn RA giảm dần theo độ tuổi, trong đó vịt dưới 8 tuần tuổi có tỷ lệ dương tính với RA là cao nhất (47,37%). Kết quả giải trình tự nucleotide gen *16s rRNA* cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn RA phân lập được đều thuộc loài *Riemerella anatipestifer*.

Từ khóa: Vi khuẩn *Riemerella anatipestifer*, nhiễm trùng huyết, vịt.

Result of isolating *Riemerella anatipestifer* bacteria from duck specimens with symptoms of septicemia disease

Vo Thanh Thin, Dang Van Tuan, Le Dinh Hai

SUMMARY

In this study, *Riemerella anatipestifer* (RA) bacteria was isolated and identified from the specimens of 408 ducks at different ages with symptoms of septicemia disease. The studied results showed that the percentage of ducks suffering with septicemia disease caused by RA was 35.04%, on average. The infection rate of ducks with RA bacteria decreased gradually by age, in which, the ducks under 8 weeks presented the highest positive rate (47.37%.) with RA bacteria. The result of analyzing sequence of the *16S rRNA* gene revealed that, all of the isolated RA bacteria strains belonged to *Riemerella anatipestifer* species.

Keywords: *Riemerella anatipestifer*, septicemia, duck.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm trùng huyết do vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* (RA) là bệnh truyền nhiễm trên vịt nuôi, ngỗng, gà tây và một số loài gia cầm khác. Bệnh được phát hiện lần đầu tiên trên vịt vào năm 1932 tại New York (Mỹ) và được gọi với các tên khác nhau như bệnh mới trên vịt (new duck disease), nhiễm trùng huyết ở vịt (duck septicemia) (Ruiz và Sandhu, 2013). Bệnh thường xảy ra ở thể cấp tính hoặc nhiễm trùng huyết mạn tính (chronic septicemia) với triệu chứng đặc trưng là tiêu chảy phân xanh, rối loạn thị giác, chảy nước mũi, ho, nhảy mũi, còi cọc, viêm hoại tử da vùng sau khớp gối, sưng phù đầu - cổ, ngoẹo cổ, rung đầu - cổ, viêm khớp, vịt đi lại khó khăn, dễ bị kích động, 2 chân duỗi ra như bơi (Li và cs., 2011). Sau khi xâm nhập vào cơ thể, vi khuẩn vào máu và gây nên tình trạng nhiễm trùng máu,

rối loạn đông máu, rối loạn tuần hoàn, hô hấp, viêm màng não mủ, viêm quanh gan, viêm màng ngoài bao tim, túi khí. Gia cầm mắc bệnh bị suy gan, suy thận và các nội tạng khác của cơ thể làm cho gia cầm chết rất nhanh. Đối với gia cầm đẻ trứng, vi khuẩn RA gây viêm vòi trứng, giảm đẻ và ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng trứng (Chikuba và cs., 2016).

Ở nước ta, bệnh do RA gây nhiễm trùng huyết trên vịt chưa được nghiên cứu và đánh giá một cách đầy đủ. Các ổ dịch lẻ tẻ vẫn thường xuyên xảy ra ở các trang trại chăn nuôi vịt, gây thiệt hại đáng kể cho người chăn nuôi. Bùi Hữu Dũng và cs. (2016) khi xác định sự hiện diện của vi khuẩn RA từ những vịt bị nhiễm trùng huyết tại một số tỉnh phía Nam bằng phương pháp PCR cho biết có 25/37 trại và 41/76 mẫu dương tính với RA, tương ứng với 67,57% và 53,94%. Gần đây, Lý Thị Liên

Khai và cs. (2018) đã phân lập vi khuẩn RA trên 150 mẫu bệnh phẩm vịt nghi mắc bệnh nhiễm trùng huyết tại Bến Tre cho thấy có 76 mẫu dương tính, chiếm tỷ lệ 50,6%. Đây là 2 nghiên cứu đầu tiên công bố về tình hình bệnh nhiễm trùng huyết do vi khuẩn RA gây ra trên vịt tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và định danh vi khuẩn RA gây bệnh nhiễm trùng huyết trên vịt tại một số tỉnh đại diện cho cả ba miền gồm Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định và Long An.

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

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập vi khuẩn RA từ vịt có triệu chứng nghi mắc bệnh nhiễm trùng huyết
- Định danh các chủng vi khuẩn RA phân lập được từ vịt mắc bệnh nhiễm trùng huyết.

2.2. Nguyên liệu nghiên cứu

- Mẫu bệnh phẩm của vịt có triệu chứng nghi mắc bệnh nhiễm trùng huyết gồm: tim/ máu tim, gan, lách, phổi.
- Môi trường nuôi cấy phân lập vi khuẩn RA: thạch máu, thạch chocolate, thạch MacConkey, BHI.
- Môi và sinh phẩm sử dụng trong phản ứng PCR khuếch đại gen *16s rRNA* để định danh vi khuẩn RA.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn RA từ mẫu bệnh phẩm

- Phương pháp lấy mẫu: mẫu được thu thập theo QCVN 01-83:2011/BNNPTNT (Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về bệnh động vật – Yêu cầu chung lấy mẫu bệnh phẩm, bảo quản và vận chuyển) tại các tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Long An. Mỗi tỉnh chọn 2 huyện, mỗi huyện chọn 2 xã, mỗi xã tối thiểu 2 trại hoặc hộ chăn nuôi. Mẫu bệnh phẩm là máu tim/ tim, phổi, gan, lách của vịt có triệu chứng bệnh nhiễm trùng huyết do RA. Mẫu được đựng trong túi nylon vô trùng, bảo quản 2 – 8°C và chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 24 giờ.

- Phương pháp phân lập: vi khuẩn RA được

phân lập dựa theo TCVN 8400-40:2016: mẫu bệnh phẩm được ria cấy lên môi trường gồm BHI, thạch máu, thạch Chocolate. Ủ 37°C trong 24 - 48 giờ. Chọn các khuẩn lạc nghi RA để cấy chuyển vào môi trường thạch máu và BHI, ủ 37°C trong 24 - 48 giờ để xác định hình thái vi khuẩn, kiểm tra đặc tính sinh hóa bằng bộ kit API 20NE (BioMérieux), định danh vi khuẩn bằng phương pháp PCR và giải trình tự gen *16s rRNA*. Chủng vi khuẩn RA chọn lọc được bảo quản ở -80°C trong dung dịch glycerol 30%.

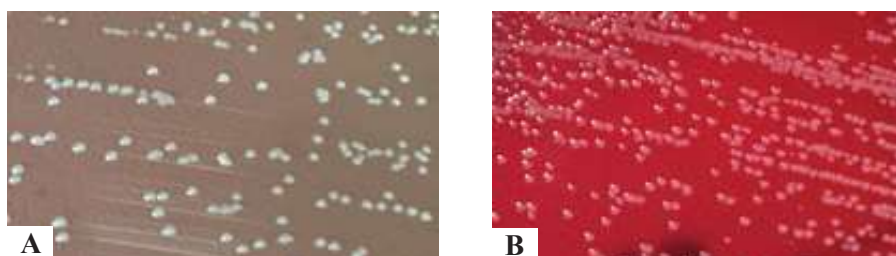
2.3.2. Phương pháp định danh vi khuẩn RA

Vi khuẩn RA được định danh bằng phương pháp PCR và giải trình tự gen *16s rRNA*, sử dụng cặp mồi đặc hiệu F-5'-CAGCTTAACGTAGAACTGC-3'/ R-5'-TCGAGATTTG-CATCACTTCG-3' (Tsai và cs., 2005), chiều dài đoạn gen được khuếch đại là 662 bp. Trình tự nucleotide trên gen *16s rRNA* được giải mã tại Công ty TNHH thương mại, sản xuất và dịch vụ Nam Khoa (Tp. Hồ Chí Minh). Chuỗi gen được xử lý bằng phần mềm BioEdit (phiên bản 7.2.5). Trình tự nucleotide của gen *16s rRNA* được so sánh với trình tự nucleotide của gen *16s rRNA* của các chủng RA tham chiếu trên Genbank bằng phần mềm BLAST. Kết quả định danh các chủng RA phân lập được dựa vào mức độ tương đồng nucleotide trên gen *16s rRNA* với trình tự nucleotide của các chủng RA tham chiếu đã được đăng tải trên Genbank. Xây dựng cây phả hệ bằng phần mềm Mega (phiên bản 6.06), sử dụng phương pháp Neighbor-joining và bootstrap với 1.000 lặp lại.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn RA từ vịt có triệu chứng nghi mắc bệnh

Để phân lập được vi khuẩn RA, chúng tôi đã tiến hành ria cấy mẫu bệnh phẩm như tim, máu tim, gan, lách và phổi vịt nghi mắc bệnh trên các loại môi trường chocolate, thạch máu, ủ 37 °C từ 24 - 48 giờ. Chọn các khuẩn lạc điển hình nghi RA: trên môi trường thạch máu vi khuẩn RA hình thành các khuẩn lạc không gây dung huyết có đường kính khoảng 1 - 2 mm, tròn lồi, trắng trong, rìa gọn, nhầy, hơi ướt. Hình dạng, kích thước và đặc điểm của khuẩn lạc RA trên môi trường chocolate cũng tương tự như trên môi trường thạch máu, tuy nhiên trên môi trường chocolate, khuẩn lạc có màu trắng xám (hình 1).



Hình 1. Khuẩn lạc RA trên môi trường thạch chocolate (A) và thạch máu (B)

Tiến hành phân lập vi khuẩn RA từ 408 mẫu bệnh phẩm vệt ở các lứa tuổi khác nhau có triệu chứng nghi mắc bệnh nhiễm trùng

huyết tại các tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định và Long An. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn RA từ vệt có triệu chứng nghi mắc bệnh

Địa điểm	Số vệt xét nghiệm (con)	Số vệt dương tính (con)	Tỷ lệ dương tính (%)
Thái Bình	96	40	41,66
Thanh Hóa	96	38	39,58
Long An	120	40	33,33
Bình Định	96	25	26,04
Tổng hợp	408	143	35,04

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, trong tổng số 408 vệt có triệu chứng nghi mắc bệnh đã phân lập được vi khuẩn RA từ 143 vệt, chiếm tỷ lệ 35,04%. Trong đó, tỷ lệ dương tính với vi khuẩn RA của vệt có triệu chứng nghi mắc bệnh ở tỉnh Thái Bình và Thanh Hóa cao hơn các tỉnh khác, lần lượt là 41,66% và 39,58%. Hai tỉnh có tỷ lệ vệt bệnh dương tính với RA thấp hơn là Bình Định (26,04%) và Long An (33,33%). Theo Ruiz và Sandhu (2013), khi vệt nhiễm một số loại vi khuẩn như *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*, *Ornithobacterium rhinotracheale* hay *Escherichia coli* gây nhiễm trùng huyết, bại huyết với các triệu chứng và bệnh tích giống nhau, rất khó phân biệt về mặt lâm sàng. Do đó, kết quả phân lập vi khuẩn RA ở các nghiên cứu khác nhau với thời điểm, địa điểm, đối tượng khác nhau sẽ cho tỷ lệ khác nhau. Nghiên cứu của Lý Thị Liên Khai và cs. (2018) cho biết, khi tiến hành phân lập vi khuẩn RA từ 150 vệt nghi mắc bệnh nhiễm trùng huyết cho thấy có 76/150 mẫu dương tính, chiếm tỷ lệ 50,7%. Tại Đan Mạch,

bệnh xuất hiện trên vệt với tỷ lệ nhiễm là 80% (Ryll và cs., 2001). Tại Ấn Độ, bệnh xảy ra trên vệt năm 2008 với tỷ lệ nhiễm RA trong đàn là 40%, tỷ lệ chết là 75% (Priya và cs., 2008). Năm 2012, bệnh xuất hiện trên vệt ở Trung Quốc với 26/56 đàn nhiễm bệnh (Wang và cs., 2012). Theo Deif và cs. (2015), bệnh được phát hiện trên vệt ở Ai Cập vào năm 2014 với tỷ lệ nhiễm trung bình là 16,7%. Việc chẩn đoán bệnh do RA gây ra rất khó phân biệt về mặt lâm sàng. Vì vậy, để chẩn đoán chính xác ca bệnh cần dựa vào kết quả phân lập vi khuẩn trong mẫu bệnh phẩm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ tập trung phân lập vi khuẩn RA, do đó kết quả này chỉ phản ánh được rằng, trong số vệt có triệu chứng của bệnh nhiễm trùng huyết thì trung bình 35,04% gây ra bởi vi khuẩn RA. Các chủng vi khuẩn này được lưu giữ cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Kết quả phân tích tỷ lệ dương tính với vi khuẩn RA theo độ tuổi của vệt có triệu chứng nghi mắc bệnh

Để xác định tỷ lệ mắc bệnh nhiễm trùng huyết

do RA theo lứa tuổi của vịt, chúng tôi tiến hành phân tích tỷ lệ nhiễm RA trên vịt có triệu chứng mắc bệnh theo 3 nhóm tuổi khác nhau (≤ 8 tuần,

$>8 - 21$ tuần và > 21 tuần tuổi). So sánh tỷ lệ dương tính với vi khuẩn RA của 3 nhóm vịt trên, kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Tỷ lệ vịt mắc bệnh nhiễm trùng huyết do RA theo độ tuổi

Địa điểm	≤ 8 tuần tuổi			$>8 - 21$ tuần tuổi			> 21 tuần tuổi		
	(n)	(+)	(%)	(n)	(+)	(%)	(n)	(+)	(%)
Thanh Hóa	32	15	46,88	32	13	40,63	32	10	31,25
Thái Bình	31	19	61,29	33	11	33,33	32	10	31,25
Bình Định	30	12	40,00	32	9	28,13	34	4	11,76
Long An	40	17	42,50	40	14	35,00	40	9	22,50
Tổng hợp	133	63	47,37	137	47	34,31	138	33	23,91

Ghi chú: (n) - số mẫu kiểm tra; (+) - số mẫu dương tính; (%) - tỷ lệ dương tính

Phân tích tỷ lệ mắc bệnh nhiễm trùng huyết do RA theo độ tuổi của vịt chúng tôi thấy rằng, vịt ở các độ tuổi khác nhau đều có thể mắc bệnh do RA với các tỷ lệ khác nhau (bảng 2). Vịt ở nhóm tuổi ≤ 8 tuần có tỷ lệ dương tính với RA cao nhất (47,37%) và 2 nhóm tuổi còn lại $> 8 - 21$ tuần tuổi có tỷ lệ dương tính với RA lần lượt là 34,31% và 23,91%. Sự khác nhau về tỷ lệ mắc bệnh do vi khuẩn RA ở các nhóm tuổi là có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với một số nghiên cứu khác về độ tuổi mắc bệnh trên vịt. Theo Phonvisay và cs. (2017), bệnh xuất hiện tại các trang trại nuôi vịt ở nam Đài Loan với tỷ lệ chết cao, chủ yếu ở vịt con. Như vậy, kết quả phân lập vi khuẩn RA từ vịt ở các lứa tuổi khác nhau cho thấy tỷ lệ vịt mắc bệnh do vi khuẩn RA giảm dần theo độ tuổi.

3.3. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn RA phân lập được

Tất cả 143 chủng vi khuẩn RA sau khi được phân lập đều được giám định lại bằng phản ứng PCR và giải trình tự nucleotide gen *16s rRNA*. Kết quả giám định bằng PCR cho thấy tất cả các chủng RA phân lập được đều cho phản ứng PCR dương tính, chiều dài đoạn gen khuếch đại được tương đương với chiều dài đoạn gen đích của cặp mồi đặc hiệu được sử dụng (hình 2).

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng cặp mồi khuếch đại gen *16s rRNA* của vi khuẩn RA theo Tsai và cs. (2005). Đây là cặp mồi có tính đặc hiệu

cao, có thể phát hiện tất cả 18/18 chủng RA phân lập được trên thực địa tại Đài Loan và 10 chủng RA tham chiếu.



Hình 2. Sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rRNA trên agarose 1,5%

(Giếng M: thang chuẩn DNA 100bp; giếng DC+: mẫu đối chứng dương; các giếng từ 1 - 8: mẫu phân lập; giếng DC-: mẫu đối chứng âm)

Ngoài ra, cặp mồi này cũng cho thấy có khả năng phân biệt được vi khuẩn RA và một số loài vi khuẩn khác như *Pasteurella multocida*, *Ornithobacterium rhinotracheale* hay *E. coli*. Như vậy, kết quả kiểm tra bằng phương pháp PCR bước đầu cho thấy, tất cả các chủng phân lập được trong nghiên cứu này của chúng tôi là vi khuẩn RA.

Hơn nữa, kết quả giải trình tự nucleotide trên gen *16S rRNA* của các chủng vi khuẩn RA phân lập được cho thấy chiều dài đoạn gen giải trình tự được là 638 bp. Các trình tự nucleotide trên gen

16S rRNA không có bất kỳ sự sai khác nào giữa các chủng phân lập được. Kết quả tra cứu bằng phần mềm BLAST cũng cho thấy tất cả các chuỗi nucleotide trên gen *16S rRNA* của các chủng RA phân lập được hoàn toàn tương đồng với gen *16S*

rRNA của vi khuẩn RA đã được công bố trên Ngân hàng gen. Kết quả so sánh trình tự nucleotide trên gen *16S rRNA* giữa các chủng RA phân lập đại diện cho các vùng nghiên cứu và chủng tham chiếu được thể hiện ở hình 3.

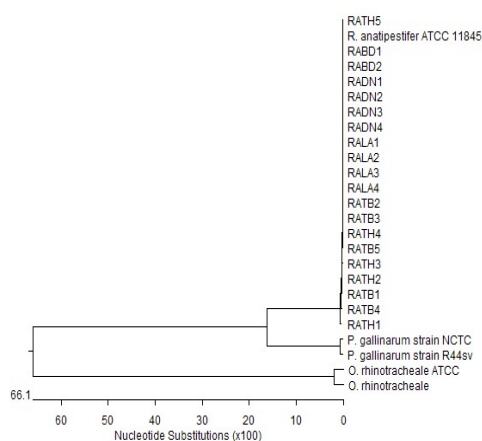


Hình 3. Trình tự nucleotide trên gen 16S rRNA của các chủng RA

(RA 11845: chủng RA tham chiếu ATCC 11845; RABD1, RABD2, RALA2, RALA3, RATH1, RATH2, RATB1, RATB2: các chủng RA phân lập từ bệnh phẩm vịt đại diện cho các vùng nghiên cứu)

Khi phân tích cây phả hệ cho thấy, tất cả các chủng RA phân lập được trên vịt mắc bệnh tại Việt Nam đều cùng nhóm với chủng vi khuẩn RA tham chiếu (chủng ATCC 11845). Trong khi đó, các giống vi khuẩn có nguồn gốc di truyền gần gũi với RA như *Pasteurella gallinarum* hay

Ornithobacterium rhinotracheale thuộc những nhóm hoàn toàn khác. Kết quả này đã khẳng định rằng, các chủng vi khuẩn chúng tôi phân lập được trên vịt có triệu chứng của bệnh nhiễm trùng huyết là đều thuộc loài *Riemerella anatipestifer*.



Hình 4. Quan hệ di truyền của các chủng RA phân lập trên vịt tại Việt Nam

IV. KẾT LUẬN

- Đã phân lập và định danh được vi khuẩn RA từ vịt có triệu chứng nghi mắc bệnh nhiễm trùng huyết. Tỷ lệ vịt có triệu chứng nghi mắc bệnh dương tính với vi khuẩn RA trung bình là 35,04%.

- Tỷ lệ vịt mắc bệnh nhiễm trùng huyết do vi khuẩn RA giảm dần theo độ tuổi: vịt ≤ 8 tuần tuổi là 47,37%; $> 8 - 21$ tuần tuổi là 34,31%; > 21 tuần tuổi là 23,91%.

- Trình tự nucleotide của gen *16S rRNA* của các chủng RA phân lập được hoàn toàn tương đồng với gen *16S rRNA* của vi khuẩn RA đã được công bố trên Ngân hàng gen.

Lời cảm ơn: Xin chân thành cảm ơn cán bộ thú y tại Chi cục Chăn nuôi – Thú y các tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định và Long An đã giúp đỡ nhóm nghiên cứu thu thập mẫu bệnh phẩm vịt nghi mắc bệnh nhiễm trùng huyết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Hữu Dũng, Đỗ Tiến Duy, Nguyễn Tất Toàn, Nguyễn Thị Thu Năm, Lê Thanh Hiền, Nguyễn Thị Phước Ninh, 2016. Xác định sự hiện diện Duck circovirus và *Riemerella anatipestifer* từ các ca bệnh bại huyết trên vịt bằng kỹ thuật PCR. *Khoa học kỹ thuật thú y*, XXIII (6), 14 – 21.
2. Lý Thị Liên Khai và Nguyễn Hiền Hậu, 2018. Bệnh bại huyết trên vịt do *Riemerella anatipestifer* gây ra tại tỉnh Bến Tre. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54 (số chuyên đề: Nông nghiệp), 90-97.
3. Chikuba, T., Uehara, H., Fumikura, S., Takahashi, K., Suzuki, Y., Hoshino, K., and Yamamoto, Y., 2016. *Riemerella anatipestifer* infection in domestic ducks in Japan, 2014. *J. Vet. Med. Sci.*, 78(10), 1635 – 1638.
4. Deif, H.N., Samir, A., Mohamed K.H., and El-Jakee, J., 2015. Identification of duck septicemia in Egypt. *Global Veterinaria*, 15, 397-400.
5. Li, J.X., Tang, Y., Gao, J.Y., Huang, C.H., and Ding, M.J., 2011. *Riemerella anatipestifer* infection in chickens. *Pak. Vet J.*, 31(1), 65 – 69.
6. Phonvisay, M., Jhong-Jie Liou, li-Ting Cheng, Yen-Ping Chen, Hsing-Chieh Wu, Chia-Hui Liu, Jai-Wei Lee, Chun-Yen Chu, 2017. Survey of a *Riemerella anatipestifer* outbreak in Soouthern Taiwan duck farms. *Taiwan Vet. J.*, 43(2), 1 - 6.
7. Priya, P. M., Pillai, D. S., Balusamy, C., Rameshkumar, P. and Senthamilselvan, P., 2008. Studies on outbreak of new duck disease in Kerela, India. *Int. J. Poult. Sci.*, 7(2), 189 – 190.
8. Ruiz, J.A. and Sandhu, T. S., 2013. *Riemerella anatipestifer* infection. In *Diseases of poultry*, 13th ed., edited by Sway D.E., Wiley Blackwell, 823 – 827.
9. Ryll, M., Christensen, H., Bisgaard, M., Christensen, J.P., Hinz, K.H. & Kohler, B., 2001. Studies on the prevalence of *Riemerella anatipestifer* in the upper respiratory tract of clinically healthy ducklings and characterization of untypable strains. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 48, 537 – 546.
10. Tsai, H.J., Liu, Y.T., Tseng, C.S. & Pan, M.J., 2005. Genetic variation of the *ompA* and *16S rRNA* genes of *Riemerella anatipestifer*. *Avian Pathology*, 34, 55-64.
11. Wang, X.P., Zhu, D.K., Wang, M.S., Cheng, A.C., Jia, R.Y., Chen, S., Chen, X.Y. & Tang, T., 2012. Development and application of specific polymerase chain reaction assay targeting the *gyrB* gene for rapid detection of *Riemerella anatipestifer*. *Poultry Science*, 91, 2450 – 2453.

Ngày nhận 11-1-2020

Ngày phản biện 25-2-2020

Ngày đăng 1-5-2020