

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH TÍNH Mẫn CẢM VỚI KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN *HAEMOPHILUS PARASUIS* PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ LỢN NGHI MẮC BỆNH TẠI MỘT SỐ TỈNH PHÍA BẮC VIỆT NAM

Trương Quang Lâm, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Thị Thu Hương

Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ sinh học thú y,

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập vi khuẩn *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) gây bệnh Glasser trên lợn và đánh giá tính mẫn cảm của chủng vi khuẩn phân lập được đối với các kháng sinh phổ thông bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Tổng số 31 chủng vi khuẩn *H. parasuis* đã được phân lập từ 58 mẫu bệnh phẩm lợn nghi mắc bệnh thuộc địa bàn các tỉnh/thành: Hà Nội, Phú Thọ, Bắc Ninh, Hưng Yên, Hà Nam, Thanh Hóa. Chủng vi khuẩn *H. parasuis* phân lập được có kích thước nhỏ, trong suốt, không dung huyết, bắt màu gram âm, trực khuẩn mảnh, đa hình thái, với các đặc tính sinh hóa là catalase, oxidase dương tính, indol, urease âm tính (phụ thuộc yếu tố V), có khả năng lên men đường glucose, sucrose, fructose, không có khả năng lên men đường mannitol và lactose, không mọc trên môi trường MacConkey. Cả 31 chủng phân lập được cho kết quả giám định PCR dương tính với *H. parasuis*. Kết quả đánh giá tính mẫn cảm kháng sinh cho thấy các chủng vi khuẩn *H. parasuis* mẫn cảm cao với cefotaxime, cefuroxime, ceftiofur, amoxicillin/clavulanic acid, florfenicol. Tuy nhiên hầu hết các chủng kiểm tra đều kháng trimethoprim/sulfamethoxazol, penicillin và tilmicosin. Các chủng vi khuẩn này mẫn cảm tương đối cao với các loại kháng sinh tổng hợp lần lượt là florfenicol-doxycycline, penicillin-streptomycin, gentamicin-tylosin. Kết quả nghiên cứu trên sẽ là tiền đề cho nghiên cứu tiếp theo về các serotype gây bệnh chính, độc lực; đóng vai trò quan trọng và cấp thiết trong công tác phòng chống và ngăn chặn mầm bệnh.

Từ khóa: Haemophilus parasuis, phân lập, đặc tính sinh hóa, PCR, kháng sinh đồ.

Study on isolation and antibiotic susceptibility determination of *Haemophilus parasuis* isolated from disease suspected pigs in some northern provinces, Viet Nam

Trương Quang Lâm, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Thị Thu Hương

SUMMARY

The aim of this study was to isolate *Haemophilus parasuis* which caused Glasser disease in pigs, and to evaluate the susceptibility of the isolated strains to common antibiotics using disk diffusion method. A total of 31 isolates of *H. parasuis* were isolated from 58 suspected pigs in Ha Noi City, Phu Tho, Bac Ninh, Hung Yen, Thanh Hoa, and Ha Nam provinces. All *H. parasuis* colonies were small, transparent, and non-hemolytic, gram negative, pleomorphic rod from short to long bacilli with the major biochemical characteristics of catalase and oxidase positive, indole and urease negative, and V factor dependence; fermentation of glucose, sucrose, fructose; while non-fermenting to mannitol, lactose; and were unable to grow on MacConkey agar. All 31 strains were positive for *H. parasuis* by PCR method. Antibiotic susceptibility test demonstrated that *H. parasuis* strains were highly susceptible to cefotaxime, cefuroxime, ceftiofur, amoxicillin/clavulanic acid, florfenicol. While most of the isolated strains were resistant to the trimethoprim/sulfamethoxazol, penicillin and tilmicosin. The isolated strains were susceptible relatively high to synthetic antibiotics including: florfenicol-doxycycline, penicillin - streptomycin, gentamicin - tylosin. The results of this study will be the basis for further studies on serotyping, pathogenicity, and play an important role in the development of effective prevention measures.

Keywords: Haemophilus parasuis, isolation, biochemical characteristic, PCR, antibiotic susceptibility test.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Glasser được mô tả lần đầu tiên bởi Glasser vào năm 1910 (Nedbalcov K và cs., 2006). Sau đó vào năm 1976, Kilian và cs. đã tiến hành nghiên cứu phân loại và đặt tên vi khuẩn là *Haemophilus parasuis*. *H. parasuis* là vi khuẩn nhỏ, đa hình thái, có tiêm mao và giáp mô, phụ thuộc vào yếu tố nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), hiếu khí hay yếm khí tùy ý, không gây dung huyết, trực khuẩn hình que gram âm, thuộc họ *Pasteurellaceae*, là tác nhân gây bệnh Glasser quan trọng ở lợn. Cho đến nay đã có 15 type huyết thanh (serotypes) đã được ghi nhận cùng với một số lượng các chủng phân lập chưa thể định type. Trong đó, một số serotype có độc lực và tỷ lệ tử vong cao như serotype 1, 5, 10, 12, 13 và 14; serotype 2, 4, 8 và 15 có độc lực thấp gây bệnh ở lợn; và serotype 3, 6, 7, 9 và 11 được coi là không có độc lực (Kielstein và cs., 1992; Nedbalcov và cs., 2006). Do sự đa dạng về các serotype hiện diện trên đàn lợn tại các quốc gia và vùng địa lý khác nhau, cũng như đáp ứng miễn dịch chéo giữa các serovar, nên rất khó để phát triển một loại vacxin bảo vệ có hiệu quả có thể sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới (Nedbalcov và cs., 2006).

Trên thế giới, việc nghiên cứu đánh giá tính nhạy cảm của các chủng vi khuẩn *H. parasuis* đối với các nhóm thuốc kháng sinh đóng vai trò quan trọng trong việc xây dựng phác đồ điều trị bệnh Glasser trên lợn (Aarestrup và cs., 2004). Kháng sinh được sử dụng rộng rãi và đã được chứng minh hiệu quả trong điều trị và kiểm soát bệnh Glasser trên lợn (Vilalta và cs., 2012). Việc sử dụng thuốc kháng sinh trong điều trị bệnh do vi khuẩn *H. parasuis* gây ra trên lợn hiện đang rất phổ biến, tuy nhiên việc lựa chọn và sử dụng thuốc kháng sinh cần phải dựa trên cơ sở xác định độ nhạy cảm của các chủng phân lập đối với các kháng sinh tương ứng (Olivera và cs., 2004; Nedbalcova và cs., 2006). Nghiên cứu tại Thụy Sĩ cho thấy các chủng *H. parasuis* phân lập đều nhạy cảm với penicillin và enrofloxacin, nhưng lại kháng với streptomycin, kanamycin, gentamicin, tetracycline, erythromycin và trimethoprim + sulfamethoxazol (Wissing và cs., 2001). Trong khi đó, các chủng phân lập tại Đan Mạch đều nhạy cảm đối với các thuốc kháng sinh được thử nghiệm như ampicillin, ciprofloxacin, erythromycin, penicillin, spectinomycin, tetracycline, tiamulin khi xét nghiệm

bằng phương pháp MIC (Aarestrup và cs., 2004).

Gần đây, Nguyen Van Chao và cs. (2019) đã khảo sát tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *H. parasuis* từ các mẫu được thu thập ngẫu nhiên trên lợn ốm và lợn khỏe mạnh ở các tỉnh Quảng Bình và Thừa Thiên-Huế thuộc miền Trung. Kết quả cho thấy tỷ lệ lợn nhiễm vi khuẩn *H. parasuis* đạt mức 6,9% (56/814) trên tổng số lợn xét nghiệm (Nguyen Van Chao và cs., 2019). Trong khi đó, Trương Quang Lâm và cs. (2019) đã tiến hành phân lập vi khuẩn *H. parasuis* từ lợn nghi mắc bệnh tại một số trại lợn trên địa bàn tỉnh Thanh Hóa, Hưng Yên và Hà Nam, và kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ dương tính với vi khuẩn *H. parasuis* đạt ở mức cao (53,6% - 22/41) đối với lợn có triệu chứng lâm sàng nghi nhiễm bệnh Glasser. Lê Văn Lãnh và cs. (2012) đã chỉ ra rằng vi khuẩn *H. parasuis* nhạy cảm cao (83 - 100% tổng số 12 chủng kiểm tra) đối với các kháng sinh thử nghiệm như amoxicillin, cefatoxime, cephalixin, ciprofloxacin, doxycycline, erythromycin và ofloxacin. Bệnh Glasser xảy ra rất phổ biến hiện nay ở nhiều tỉnh/thành miền Bắc, tuy nhiên các nghiên cứu về phân lập và đánh giá khả năng mẫn cảm với kháng sinh của vi khuẩn *H. parasuis* hiện còn rất hạn chế và rất cần được quan tâm nghiên cứu. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi tập trung nghiên cứu phân lập vi khuẩn *H. parasuis* gây bệnh Glasser trên lợn tại một số tỉnh miền Bắc, và xác định tính mẫn cảm của các chủng phân lập đối với các kháng sinh thường dùng để từ đó xây dựng phương pháp điều trị và biện pháp phòng ngừa kịp thời nhằm giảm thiểu thiệt hại do vi khuẩn *H. parasuis* gây ra trên đàn lợn tại Việt Nam.

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

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập vi khuẩn *H. parasuis* gây bệnh Glasser trên lợn nghi mắc bệnh tại một số tỉnh phía bắc Việt Nam.

- Xác định tính mẫn cảm của các chủng vi khuẩn *H. parasuis* phân lập được đối với một số kháng sinh thông thường.

2.2. Nguyên liệu nghiên cứu

Môi trường, hóa chất sử dụng bao gồm: blood agar base (BD), Brain heart infusion broth – BHI (Merck), Microbiology agar (Merck), thạch MacConkey (BD), Catalase (Hydrogen peroxide 3%, Merck), Oxidase (1% N, N-dimethyl-p-phenylenediamine hydrochloride, Sigma), Kovac's/Indol (Merck), Urea base (BD), bộ kit nhuộm Gram (Merck), Glucose (Merck), Lactose (Merck), Sucrose (Sigma), Mannitol (Merck), Fructose (Sigma), Nicotinamide adenine dinucleotide sodium salt (NAD, Sigma), huyết thanh thai bò (FBS - Fetal bovine serum, Gibco), kit chiết tách DNA (Qiagen).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thu thập mẫu bệnh phẩm

Lợn nghi mắc bệnh Glasser có triệu chứng lâm sàng như sốt cao, ho, thờ thể bụng, ăn kém, gầy, sút cân, sưng khớp và mổ khám có bệnh tích khớp sưng tích dịch; màng phổi, màng tim hoặc đa xoang viêm fibrin bám dính; đa xoang viêm tích nước. Mẫu bệnh phẩm được thu thập bao gồm dịch khớp và phổi từ mỗi lợn nghi mắc bệnh Glasser (Turni và cs., 2007) tại địa bàn thuộc các tỉnh Hà Nội, Phú Thọ, Bắc Ninh, Hưng Yên, Hà Nam, Thanh Hóa trong khoảng thời gian từ năm 2018 đến đầu năm 2019.

2.3.2. Nuôi cấy và phân lập vi khuẩn *H. parasuis*

Vi khuẩn *H. parasuis* được nuôi cấy và phân lập theo Trương Quang Lâm và cs. (2019). Các mẫu bệnh phẩm bao gồm dịch khớp, phổi được nuôi cấy trên môi trường thạch máu sử dụng 5% máu cừu (SBA) có kèm đường cấy vi khuẩn *S. aureus* ở điều kiện hiếu khí 37°C với 5% CO₂ trong thời gian 24 - 48 giờ. Các đĩa thạch được kiểm tra mỗi 24 giờ về sự phát triển của khuẩn lạc cho đến 48 giờ. Các khuẩn lạc nghi ngờ vi khuẩn *H. parasuis* được cấy chuyển sang môi trường thạch tương tự hoặc môi trường tăng sinh Brain heart infusion broth có bổ sung 0,01% yếu tố V - nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) và huyết thanh để giám định đặc tính sinh học: bắt màu gram, catalase, indol, urease, oxidase, khả năng phụ thuộc NAD, khả năng lên men đường glucose, sucrose, fructose, mannitol và lactose, khả năng mọc trên môi trường MacConkey.

2.3.3. Giám định vi khuẩn *H. parasuis* bằng phương pháp PCR

Phương pháp tách chiết DNA và phương pháp PCR được thực hiện giống như mô tả trước đây (Trương Quang Lâm và cs., 2019; Oliveira và cs., 2001). DNA của vi khuẩn được tách chiết sử dụng kit chiết tách DNA thương mại QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Mỹ). Quy trình chiết tách DNA được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng PCR dùng để giám định các chủng phân lập sử dụng cặp mồi đặc hiệu (HPS-F: 5'-GTGATGAGGAAGGGTGGTGT-3'; HPS-R: 5'-GGCTTCGTCACCCTCTGTA-3') khuếch đại đoạn gen 16S rRNA của vi khuẩn *H. parasuis*. Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 5,5 µl nuclease-free water; 12,5 µl master mix; 1 µl reverse primer; 1 µl forward primer; 5 µl khuôn mẫu DNA. Chu trình nhiệt được thực hiện gồm 3 bước bao gồm: Tiền biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút; chu kỳ lặp lại 30 lần: Biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 56°C trong 60 giây, tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 90 giây; hoàn thành ở 72°C trong 7 phút. Điện di và đọc kết quả: Sản phẩm PCR được điện di trên gel 1% (TBE 1X) với thang DNA chuẩn 100bp (marker). Sử dụng nguồn điện di ở hiệu điện thế 100V cường độ 100mA, thời gian chạy điện di trong 40 phút. Sản phẩm PCR có kích thước 821 bp.

2.3.4. Thử kháng sinh đồ

Sử dụng phương pháp khuếch tán trên thạch để thử nghiệm khả năng mẫn cảm của vi khuẩn *H. parasuis* với 21 loại kháng sinh phổ thông (Lương Thị Xuân Quỳnh và cs., 2018): Amoxicillin (Ax-10µg), amoxicillin/clavulanic acid (Ac-20/10 µg), cefotaxime (Ct-30µg), ceftiofur (Cf-30µg), cefuroxime (Cu-30µg), ciprofloxacin (Ci-5µg), colistin (Co-10µg), doxycyclin (Dx-30µg), enrofloxacin (Enr-5µg), florfenicol (Ffc-30µg), gentamicin (Ge-10µg), norfloxacin (Nx-10µg), penicillin (Pn-10UI), streptomycin (Sm-10µg), tetracyclin (Te-30µg), tilmicosin (Til-15µg), trimethoprim/sulfamethazol (Bt-1,25/23,75µg), florfenicol - doxycycline (Flo/Doxy-40/20µg), gentamicin

- tylosin (Genta/Tylo-30/15µg), lincomycin - spectinomycin (Linco/Spec-2/100µg), penicillin - streptomycin (Pen/Strep-15/15µg) (Oxoids, Mỹ và Nam Khoa, Việt Nam). Kết quả được đánh giá dựa trên tiêu chuẩn của CLSI (2018).

2.3.5. Xử lý số liệu

Số liệu được ghi chép và tính toán bằng phần mềm Excel 2010.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *H. parasuis* từ mẫu bệnh phẩm

Kết quả phân lập vi khuẩn *H. parasuis* từ các mẫu bệnh phẩm phổi (hình 1A và 1B), dịch khớp của lợn nghi mắc bệnh Glasser cho thấy 31 chủng vi khuẩn *H. parasuis* đã được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm của 58 lợn nghi mắc bệnh Glasser chiếm tỷ lệ 53,4% (31/58) (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn *H. parasuis* từ các lợn nghi mắc bệnh Glasser tại các địa phương

STT	Địa phương	Số lượng mẫu	Kết quả phân lập		
			Chủng phân lập	PCR dương tính	Tỷ lệ (%)
1	Hưng Yên	19	12	12	63,2
2	Phú Thọ	7	4	4	57,1
3	Hà Nam	11	6	6	54,5
4	Thanh Hóa	10	5	5	50,0
5	Bắc Ninh	8	3	3	37,5
6	Hà Nội	3	1	1	33,3
Tổng		58	31	31	53,4

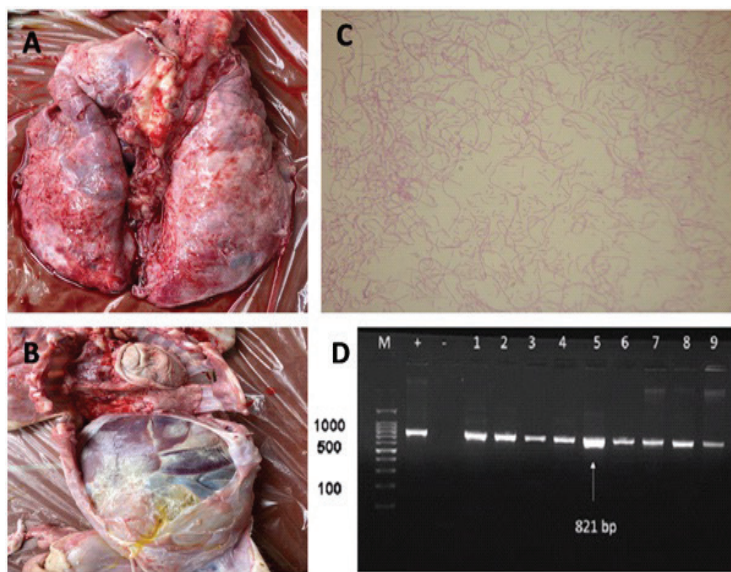
Giám định đặc tính sinh học của các chủng nghi vi khuẩn *H. parasuis* cho thấy 31 chủng đều bắt màu gram âm, trực khuẩn dạng sợi đa hình thái từ trực khuẩn ngắn, sợi ngắn đến dạng sợi dài (hình 1C), có phản ứng catalase và oxidase dương tính, urease và indol âm tính, và phụ thuộc vào yếu tố V (NAD) cho sự phát triển. Có 31 chủng có khả năng lên men đường glucose, sucrose và fructose; không có khả năng lên men đường mannitol và lactose. Tất cả các chủng đều không phát triển trên môi trường MacConkey. Các chủng phân lập trong nghiên cứu này đều có đặc tính sinh học phù hợp với các nghiên cứu trước đây về vi khuẩn *H. parasuis* (Keilstein và cs., 2001; Olivera và cs., 2004; Pereira và cs., 2017). Định danh các chủng phân lập bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu đối với vi khuẩn *H. parasuis* cho thấy cả 31 chủng phân lập cho kết quả PCR dương tính, sản phẩm PCR đặc hiệu có kích

thước 821 bp như thiết kế (bảng 1 và hình 1D).

Như vậy, 31 mẫu trong tổng số 58 mẫu được xét nghiệm cho kết quả dương tính với vi khuẩn *H. parasuis*; chiếm tỷ lệ 53,4%. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với nghiên cứu công bố trước đây của Trương Quang Lâm và cs. (2019). Tỷ lệ phân lập vi khuẩn *H. parasuis* cao có thể lý giải bởi các mẫu bệnh phẩm nghiên cứu đều được thu thập từ lợn nghi nhiễm bệnh Glasser với các triệu chứng lâm sàng điển hình như sốt cao, ho, thở thở bụng, ăn kém, gầy, sút cân, sưng khớp; và mô khám có bệnh tích đại thể như viêm tơ huyết ở phổi, tim, phúc mạc, xoang bụng. Tuy nhiên, tỷ lệ phát hiện *H. parasuis* cao hơn đáng kể so với nghiên cứu của Cai và cs. (2005): trong 828 mẫu được thu thập trong giai đoạn 2003 – 2004 tại Trung Quốc đã ghi nhận 183 mẫu dương tính với vi khuẩn *H. parasuis* (chiếm tỷ lệ 22,1%). Tại Việt Nam, Lương Thị Xuân Quỳnh và cs. (2018) và

Nguyen Van Chao và cs. (2019) đã tiến hành khảo sát vi khuẩn *H. parasuis* trên các mẫu bệnh phẩm thu thập từ lợn khỏe và lợn bệnh trên địa bàn một số tỉnh miền Trung và miền Nam. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ nhiễm lần lượt là 8,6% (21/245) và 6,9% (56/814). Sự

khác nhau về tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *H. parasuis* giữa các nghiên cứu có thể do sự khác biệt về số mẫu khảo sát, đối tượng nghiên cứu, các yếu tố địa lý, môi trường, thời tiết, quy mô và điều kiện chăn nuôi, hoặc cũng có thể do kỹ thuật và/hoặc điều kiện xét nghiệm.



Hình 1. Hình ảnh bệnh tích điển hình ở lợn mắc bệnh Glasser do vi khuẩn *H. parasuis* gây ra
 (A) Viêm màng phổi phủ fibrin; (B) Bệnh tích đại thể lợn nhiễm bệnh Glasser; (C) Hình thái chủng vi khuẩn *H. parasuis* phân lập được, vi khuẩn bắt màu Gram âm, trực khuẩn dạng sợi nhỏ mảnh dài;
 (D) Kết quả định danh các chủng *H. parasuis* bằng phản ứng PCR

3.2. Kết quả phân lập vi khuẩn *H. parasuis* tại một số địa phương

Kết quả bảng 1 cho thấy các mẫu bệnh phẩm từ lợn nghi mắc bệnh Glasser thu thập ở tỉnh Hưng Yên cho tỷ lệ dương tính cao nhất với 63,2%; tiếp đến là Phú Thọ, Hà Nam, Thanh Hóa, Bắc Ninh và Hà Nội với tỷ lệ lần lượt là 57,1%; 54,5%; 50,0%; 37,5% và 33,3%. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ các chủng phân lập được tại Hưng Yên, Hà Nam, Thanh Hóa tương đồng với kết quả phân lập các chủng vi khuẩn *H. parasuis* trong giai đoạn 2016 - 2017 của Trương Quang Lâm và cs. (2019). Mặc dù lượng mẫu được thu thập dùng để chẩn đoán phân lập mầm bệnh chưa đủ lớn để đánh giá dịch tễ bệnh giữa các tỉnh, tuy nhiên kết quả thực tế cho thấy tỷ lệ nhiễm rất cao ở các địa phương thu thập mẫu bệnh phẩm.

Yếu tố dịch tễ của bệnh, đặc biệt sự lưu hành của các serotype khác nhau của vi khuẩn *H. parasuis* phụ thuộc vào vùng địa lý, khí hậu khác nhau, mỗi địa phương khác nhau, tỷ lệ phân lập các serotype của vi khuẩn này cũng cao thấp khác nhau (Nedbalcov và cs., 2006). Cần triển khai các nghiên cứu trên diện rộng để xác định được chính xác dịch tễ bệnh cũng như làm rõ sự lưu hành của các serotype gây bệnh, từ đó xác định được các serotype gây bệnh chính tại Việt nam và lựa chọn các chủng vi khuẩn đại diện phù hợp phục vụ nghiên cứu và phát triển chế phẩm và vaccin phòng bệnh có hiệu quả.

3.3. Kết quả khảo sát sự miễn cảm kháng sinh của các chủng vi khuẩn *H. parasuis* phân lập

Sau khi 31 chủng vi khuẩn *H. parasuis* được khẳng định bằng phương pháp nuôi cấy phân lập

cũng như phương pháp PCR, chúng được sử dụng để xác định mức độ mẫn cảm và kháng với một số loại kháng sinh đang được sử dụng phổ biến

trong chăn nuôi lợn hiện nay. Xét nghiệm kháng sinh đồ được thực hiện bằng kỹ thuật khuếch tán trên thạch với kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định sự mẫn cảm kháng sinh của các chủng vi khuẩn *H. parasuis* phân lập

Nhóm kháng sinh	Kháng sinh	Số kiểm tra	Mẫn cảm		Kháng	
			Số mẫn cảm	Tỷ lệ (%)	Số kháng	Tỷ lệ (%)
Aminoglycozid	Gentamicin	31	15	48,4	16	51,6
	Streptomycin	31	13	41,9	18	58,1
β – lactamin	Amoxicillin	31	10	32,3	21	67,7
	Amoxicillin/clavulanic acid	31	22	71,0	9	29,0
	Cefotaxime	31	25	80,6	6	19,4
	Ceftiofur	31	23	74,2	8	25,8
	Cefuroxime	31	24	77,4	7	22,6
	Penicillin	31	3	9,7	28	90,3
	Colistin	31	8	25,8	23	74,2
Dapeptid	Tilmicosin	31	6	19,4	25	80,6
Macrolid	Florfenicol	31	21	67,7	10	32,3
Quinolon	Ciprofloxacin	31	19	61,3	12	38,7
	Enrofloxacin	31	20	64,5	11	35,5
	Norfloxacin	31	18	58,1	13	41,9
Tetracyclin	Doxycyclin	31	19	61,3	12	38,7
	Tetracycline	31	8	25,8	23	74,2
Kháng sinh kép	Florfenicol – doxycycline	31	30	96,8	1	3,2
	Gentamicin – tylosin	31	19	61,3	12	38,7
	Lincomycin – spectinomycin	31	14	45,2	17	54,8
	Penicillin – streptomycin	31	21	67,7	10	32,3
	Trimethoprim/sulfamethazol	31	0	0,0	31	100,0

Kết quả chỉ ra rằng các chủng vi khuẩn *H. parasuis* đặc biệt mẫn cảm với cefotaxime (80,6% số chủng) và cefuroxime (77,4% số chủng), ceftiofur (74,2% số chủng), tiếp đến là kháng sinh amoxicillin/clavulanic acid (71,0% số chủng), florfenicol (67,7% số chủng). Tuy nhiên với các kháng sinh thông dụng như penicillin và trimethoprim/sulfamethoxazol; số chủng kháng lần lượt là 90,3% và 100% số chủng kiểm tra. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Lê Văn Lãnh và cs. (2012) cho biết *H. parasuis* kháng 100% với kháng sinh penicillin. Đáng chú ý, kết quả của nghiên cứu này cho thấy tỷ lệ các chủng vi

khuẩn *H. parasuis* phân lập tại miền Bắc Việt Nam có hiện tượng kháng thuốc ngày càng tăng với một số kháng sinh phổ thông như tilmicosin (80,6%), tetracycline và colistin (74,2%), amoxicillin (67,7%), streptomycin (58,1%), gentamicin (51,6%), norfloxacin (41,9%), ciprofloxacin và doxycyclin (38,7%), enrofloxacin (35,5%).

Ngoài ra, chúng tôi cũng tiến hành nghiên cứu đánh giá tính mẫn cảm của các chủng *H. parasuis* phân lập được với các loại kháng sinh tổng hợp phổ thông hiện có trên thị trường (bảng 2). Kết quả trình bày ở bảng 2 cho thấy các chủng vi khuẩn *H. parasuis* có tỷ lệ mẫn cảm tương đối

cao với các kháng sinh tổng hợp: florfenicol - (67,7%), gentamicin - tylosin (61,3%), lincomycin - doxycycline (96,8%), penicillin - streptomycin - spectinomycin (45,2%).

Bảng 3. Kết quả xác định sự mẫn cảm kháng sinh của các chủng vi khuẩn *H. parasuis* phân lập tại các địa phương

STT	Địa phương	Mẫn cảm cao	Kháng cao
1	Hưng Yên	Ac, Ct, Cf, Enr, Flo/Doxy	Bt, Pn
2	Phú Thọ	Ct, Cu, Ffc, Flo/Doxy, Pen/Strep	Bt, Pn
3	Hà Nam	Cf, Cu, Ffc, Flo/Doxy	Bt, Pn, Til
4	Thanh Hóa	Ac, Cu, Enr, Ffc, Flo/Doxy	Bt, Pn
5	Bắc Ninh	Ac, Ct, Flo/Doxy, Pen/Strep	Bt, Pn
6	Hà Nội	Ct, Cf, Cu, Flo/Doxy, Pen/Strep	Bt

Ghi chú: Ac: amoxicillin/clavulanic acid, Bt: trimethoprim/sulfamethazol, Cf: ceftiofur, Ct: cefotaxime, Cu: cefuroxime, Enr: enrofloxacin, Flo/Doxy: florfenicol - doxycycline, Ffc: florfenicol, Pen/Strep: penicillin - streptomycin, Pn: penicillin, Til: tilmicosin.

Bảng 3 cho thấy, các chủng vi khuẩn *H. parasuis* phân lập tại các địa phương mẫn cảm với các kháng sinh không giống nhau. Tuy nhiên, hầu hết các chủng vi khuẩn *H. parasuis* phân lập được mẫn cảm cao với kháng sinh florfenicol - doxycycline (Flo/Doxy) và các kháng sinh thuộc nhóm β - lactamin như: cefotaxime (Ct), cefuroxime (Cu), ceftiofur (Cf), amoxicillin/clavulanic acid (Ac). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy rằng vi khuẩn *H. parasuis* đã kháng cao với trimethoprim/sulfamethazol (Bt) và penicillin (Pn).

Khi xác định tính mẫn cảm với kháng sinh của các chủng *H. parasuis* phân lập từ thực địa, các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng nhiều loại kháng sinh phổ biến dùng trong điều trị đã bị *H. parasuis* kháng lại với tỷ lệ cao. Tất cả các chủng *H. parasuis* phân lập tại Thụy Sĩ đều kháng với streptomycin, kanamycin, gentamicin, tetracycline, erythromycin và trimethoprim + sulfamethoxazol (Wissing và cs., 2001). Các chủng vi khuẩn *H. parasuis* phân lập tại Trung Quốc đã đề kháng cao với enrofloxacin (70,9%) và trimethoprim/sulphamethoxazole (44,5%) (Xueli Zhou và cs., 2010). Những kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Tuy nhiên, các chủng phân lập của vi khuẩn *H. parasuis* tại Đan Mạch đều nhạy cảm đối với các kháng sinh thử nghiệm như ampicillin, ciprofloxacin,

erythromycin, penicillin, spectinomycin, tetracycline, tiamulin khi xét nghiệm bằng phương pháp MIC (Aarestrup và cs., 2004). Như vậy, các chủng vi khuẩn *H. parasuis* phân lập tại Việt Nam có tỷ lệ kháng kháng sinh cao hơn so với các công bố trên thế giới. Có rất nhiều nguyên nhân dẫn đến hiện tượng này, bao gồm việc sử dụng các loại kháng sinh điều trị không đủ liều, điều trị kéo dài hoặc sự có mặt thường xuyên của nhiều loại kháng sinh được bổ sung vào thức ăn, hiện tượng di truyền dọc và truyền ngang tính kháng thuốc bởi các gen nằm trong plasmid của các nhóm vi khuẩn. Vì vậy phải có một chiến lược sử dụng thuốc kháng sinh trong chăn nuôi và thú y phù hợp để ngăn chặn kịp thời hiện tượng này vì nó ảnh hưởng trực tiếp đến con người và môi trường. Việc lạm dụng kháng sinh để phòng và chữa bệnh cho động vật nói chung, gia cầm và lợn nói riêng đang là một vấn đề bức xúc của xã hội, gây ra không ít khó khăn cho ngành thú y và cả nhân y. Vì yếu tố kháng kháng sinh của các vi khuẩn luôn luôn thay đổi theo thời gian, không gian khác nhau. Kết quả đánh giá tính nhạy cảm kháng sinh của các chủng phân lập vi khuẩn *H. parasuis* trong nghiên cứu này sẽ là cơ sở xây dựng phác đồ điều trị bệnh hiệu quả, và góp phần nâng cao khả năng kiểm soát bệnh Glasser trên đàn lợn, giảm thiểu tổn thất do vi khuẩn *H. parasuis* gây ra cho người chăn nuôi.

IV. KẾT LUẬN

Tổng số 31 chủng vi khuẩn *H. parasuis* được phân lập từ 58 lợn nghi mắc bệnh thuộc địa bàn Hà Nội, Phú Thọ, Bắc Ninh, Hưng Yên, Hà Nam, Thanh Hóa; chiếm tỷ lệ 53,4%. Các chủng vi khuẩn *H. parasuis* phân lập có kích thước khuẩn lạc nhỏ, trong suốt, không dung huyết, phụ thuộc vào yếu tố V, và mang đầy đủ các đặc tính sinh học của loài. Các chủng phân lập đều cho kết quả PCR dương tính. Trong nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn *H. parasuis* phân lập được mẫn cảm cao với cefotaxime (80,6%) và cefuroxime (77,4%), ceftiofur (74,2%), tiếp đến là amoxicillin/clavulanic acid (71,0%), florfenicol (67,7%). Tuy nhiên, các chủng phân lập có tỷ lệ kháng rất cao với các kháng sinh như trimethoprim/sulfamethoxazol (100,00%), penicillin (90,3%) và tilmicosin (80,6%). Tỷ lệ mẫn cảm của vi khuẩn *H. parasuis* phân lập với các loại kháng sinh tổng hợp lần lượt là: florfenicol - doxycycline (96,8%), penicillin - streptomycin (67,7%), gentamicin - tylosin (61,3%), lincomycin - spectinomycin (45,2%).

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện thông qua nguồn kinh phí của đề tài (Mã số T2018-03-02TĐ) của Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Trân trọng cảm ơn nhóm sinh viên nghiên cứu khoa học và các cán bộ nghiên cứu của phòng thí nghiệm trọng điểm CNSH Thú y trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đinh Xuân Phát, Lương Thị Xuân Quỳnh, Đỗ Thị Thùy Dương, Hoàng Thị Phụng, 2018. Định danh và xét nghiệm kháng sinh đồ vi khuẩn *Haemophilus parasuis* lưu hành trong trại chăn nuôi heo trên địa bàn một số tỉnh phía Nam Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển trường ĐH Nông lâm Tp. HCM*, số 5, tr. 68-76.
- Nedbalcov K., Satran P., Jaglic Z., Ondriasova R., Kucerova Z., 2006. *Haemophilus parasuis* and Glässer's disease in pigs: A review. *Veterinari Medicina*, 51 (5): 168-179.
- Nguyen Van Chao, Vu Thi Thanh Tam, Zoua G., Jiaa M., Wang Q., Zhanga L., Ding W., Huang Q., Zhou R, 2019. Characterization of serotypes and virulence genes of *Haemophilus parasuis* isolates from Central Vietnam. *Vet Microbiol*, 230:112-117.
- Pereira D. A., Dalla Costa F. A., Ferroni L. B., Moraes C. N., Schocken-Iturrino R. P., Oliveira L. G., 2017. The challenges with Glässer's disease in technified pig production. *Austral J. Vet. Sci.* 49 (2), 63-69.
- San Millan A., Escudero J. A., Catalan A., Nieto S., Farelo F., Gibert M., Moreno M. A., Dominguez L., Gonzalez-Zorn B, 2007. Beta-Lactam resistance in *Haemophilus parasuis* is mediated by plasmid pB 1000 Bearing blaROB - 1. *Antimicrob Agents Chemother.*, 51:2260-4.
- Solano G. I., Segalés J., Collins J. E., Molitor T. W., Pijoan C., 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) in teraction with *Haemophilus parasuis*. *Vet Microbiol.* 55:247-57.
- Trương Quang Lâm, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Thị Huyền, 2018. Nghiên cứu phân lập và xác định serotyp các chủng vi khuẩn *Haemophilus parasuis* phân lập từ lợn tại tỉnh Thanh Hóa, Hưng Yên, Hà Nam. *Vietnam J. Agri. Sci.* 2018, Vol. 16, No. 12: 1068-1078.
- Turni C., Blackall P., 2007. Comparison of sampling sites and detection methods for *Haemophilus parasuis*. *Aust Vet J.* 85(5): 177-184.
- Vilalta C, Galofré N, Aragon V, Pérez de Rozas AM, Fraile L., 2012. Effect of Marbofloxacin on *Haemophilus Parasuis* Nasal Carriage. *Vet Microbiol.* 159(1-2):123-9.
- Wissing A., Nicolet J., Boerlin P., 2001. The current antimicrobial resistance situation in Swiss veterinary medicine. *Schweiz arch Tierheilkd.*, 143:503-10.
- Zhou X, Xu X, Zhao Y, Chen P, Zhang X, Chen H, Cai X., 2010. Distribution of antimicrobial resistance among different serovars of *Haemophilus parasuis* isolates. *Vet Microbiol.* 141(1-2):168-73.

Ngày nhận 25-10-2020

Ngày phản biện 26-12-2020

Ngày đăng 1-5-2021