

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

TRẦN ĐỨC HẠNH

**NGHIÊN CỨU VAI TRÒ CỦA *E. COLI*, *SALMONELLA*,
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS GÂY TIÊU CHẢY Ở LỢN
TẠI 3 TỈNH MIỀN NÚI PHÍA BẮC VÀ BIỆN PHÁP PHÒNG TRỊ**

Chuyên ngành: Vi sinh vật học thú y

Mã số: 62 64 01 04

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

***Hướng dẫn khoa học* : 1. GS.TS. Nguyễn Quang Tuyên**

2. PGS.TS. Cù Hữu Phú

THÁI NGUYÊN, 2013

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan rằng: Đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi, các số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận án này là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác và chưa từng sử dụng để bảo vệ một học vị nào.

Tôi xin cam đoan mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện đề tài nghiên cứu và hoàn thành luận án đều đã được cảm ơn, các thông tin trích dẫn chính xác và đã được chỉ rõ nguồn gốc.

Thái Nguyên, tháng 03 năm 2012

Tác giả

NCS. Trần Đức Hạnh

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình thực hiện đề tài và hoàn thành bản luận án, tôi luôn nhận được sự giúp đỡ của nhiều tổ chức và cá nhân. Nhân dịp này tôi xin cảm ơn Ban Giám đốc Đại học Thái Nguyên, Ban Chủ nhiệm Khoa Sau Đại học, Khoa Chăn Nuôi Thú Y, Trường Đại Học Nông Lâm Thái Nguyên đã tạo điều kiện cho tôi được theo học chương trình đào tạo nghiên cứu sinh tại trường.

Tôi xin chân thành cảm ơn tập thể cán bộ thuộc bộ môn Vi sinh vật-Khoa Chăn Nuôi Thú Y - Trường ĐHNL Thái Nguyên, Bộ Môn Vi Trùng -Viện Thú Y Quốc Gia đã nhiệt tình giúp đỡ tạo điều kiện thuận lợi nhất để tôi hoàn thành đề tài nghiên cứu.

Đặc biệt, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến các thầy hướng dẫn khoa học là GS.TS. Nguyễn Quang Tuyên - Phó Viện Trưởng Viện Khoa học và Sự sống thuộc ĐH Thái Nguyên và PGS.TS. Cù Hữu Phú - Trưởng Bộ Môn Vi Trùng - Viện Thú Y Quốc Gia đã trực tiếp hướng dẫn giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài và hoàn thành luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến Ban lãnh đạo và các thầy cô giáo - Viện Thú Y Quốc Gia đã cung cấp tài liệu, những ý kiến quý báu và hướng dẫn cách thao tác một số thí nghiệm quan trọng để tôi hoàn thiện đề tài nghiên cứu.

Tôi luôn biết ơn gia đình, bạn bè và các học viên cao học, các em sinh viên đã đóng góp công sức, động viên, giúp đỡ tôi hoàn thành luận án này.

Thái Nguyên, tháng 03 năm 2012

Tác giả

NCS. Trần Đức Hạnh

BẢNG CÁC CHỮ VIẾT TẮT TRONG LUẬN ÁN

| | |
|------------------------|---|
| A | : Adenin |
| ATCC | : American Type Culture Collection |
| BHI | : Brain Heart Infusion |
| bp | : base pair |
| BT | : Bình thường |
| C | : Cytosin |
| CAMP | : Christie Atkins Munch Petersen |
| CFU | : Colony Forming Unit |
| cs | : Cộng sự |
| <i>Cl. perfringens</i> | : <i>Clostridium perfringens</i> |
| DNA | : Deoxyribonucleic Acid |
| dNTP | : deoxyribonucleotide triphosphate |
| <i>E.coli</i> | : <i>Escherichia coli</i> |
| ELISA | : Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| ETEC | : Enterotoxine của vi khuẩn <i>E.coli</i> |
| EYA | : Egg Yolk Agar |
| FAO | : Food and Agriculture Organization |
| G | : Guanin |
| HBS | : Haemorrhagic bowel syndrome |
| kDa | : kilo Dalton |
| KM | : Khoẻ mạnh |
| LD | : Lethal dose |
| LT | : Độc tố chịu nhiệt |
| µl | : microlitre |
| NCCLS | : National Committee of Clinical Laboratory Standards |
| OR | : Odds Ratio |
| RNA | : Ribonucleic Acid |
| rRNA | : Ribosomal Ribonucleic Acid |
| PCR | : Polymerase Chain Reaction |
| S | : <i>Salmonella</i> |
| STA | : Độc tố không chịu nhiệt |
| SIM | : Sulfide - Indole – Motility |
| T | :Thymin |
| TAE | : Tris - Acetate – EDTA |
| TE | : Tris – EDTA |
| TC | : Tiêu chảy |
| TGC | : Thioglycollate |
| TGE | : Transmissible gastroenteritis |
| TSC | : Tryptose Sulphite Cycloserine |

MỤC LỤC

| | |
|---|-----------|
| MỞ ĐẦU | 1 |
| Chương 1.TỔNG QUAN TÀI LIỆU | 4 |
| 1.1. Một số nguyên nhân và hiểu biết chung về hội chứng tiêu chảy ở lợn..... | 4 |
| 1.1.1. Rối loạn tiêu hóa do môi trường ngoại cảnh bất lợi | 4 |
| 1.1.2. Rối loạn tiêu hoá do thức ăn, nước uống không đảm bảo | 5 |
| 1.1.3. Một số vi sinh vật gây tiêu chảy gia súc | 5 |
| 1.2. Vai trò của một số vi khuẩn trong hội chứng tiêu chảy ở lợn | 7 |
| 1.2.1. Vi khuẩn <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) | 7 |
| 1.2.2. Vi khuẩn <i>Salmonella spp.</i> trong hội chứng tiêu chảy ở lợn | 20 |
| 1.2.3. Vai trò của vi khuẩn đường ruột <i>Clostridium Perfringens</i> (<i>Cl. Perfringens</i>) trong trong hội chứng tiêu chảy ở gia súc | 28 |
| 1.3. Biện pháp phòng trị hội chứng tiêu chảy ở lợn con do vi khuẩn gây ra | 32 |
| 1.3.1. Biện pháp phòng | 32 |
| 1.3.2. Điều trị tiêu chảy ở lợn..... | 35 |
| Chương 2. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP | |
| NGHIÊN CỨU | 36 |
| 2.1. Nội dung nghiên cứu | 36 |
| 2.1.1. Nghiên cứu tình hình tiêu chảy ở lợn con tại 3 tỉnh miền núi phía Bắc, Thái Nguyên, Bắc Giang, Vĩnh Phúc. | 36 |
| 2.1.2. Phân lập, xác định 3 loại vi khuẩn là <i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> và <i>Cl. perfringens</i> ở lợn con bình thường và bị tiêu chảy. | 36 |
| 2.1.3. Nghiên cứu một số đặc tính sinh học của các chủng vi khuẩn phân lập được. | 36 |
| 2.1.4. Nghiên cứu một số biện pháp phòng và trị hội chứng tiêu chảy ở lợn | 36 |
| 2.2. Nguyên liệu dùng trong nghiên cứu | 36 |
| 2.2.1. Đối tượng nghiên cứu | 36 |
| 2.2.3. Địa điểm nghiên cứu | 37 |
| 2.3. Phương pháp nghiên cứu | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.1. Phương pháp điều tra | 37 |
| 2.3.2. Phương pháp lấy mẫu và phân lập vi khuẩn | 38 |
| 2.3.3. Nghiên cứu đặc tính sinh vật học của vi khuẩn | 38 |
| 2.3.4. Phương pháp xác định type kháng nguyên của vi khuẩn phân lập được | 39 |
| 2.3.5. Phương pháp xác định các yếu tố gây bệnh của vi khuẩn phân lập được | 43 |
| 2.3.6. Phương pháp xác định khả năng miễn cảm kháng sinh của các chủng vi khuẩn phân lập được | 47 |
| 2.5. Phương pháp chế tạo autovacxin vô hoạt có bổ trợ keo phèn | 48 |
| 2.6. Phương pháp xử lý số liệu..... | 49 |
| Chương 3 : KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN | 51 |
| 3.1. Kết quả điều tra lợn con dưới hai tháng tuổi mắc tiêu chảy tại các tỉnh nghiên cứu | 52 |
| 3.1.1. Kết quả điều tra tỷ lệ lợn con bị tiêu chảy và chết ở các lứa tuổi | 53 |
| 3.2. Kết quả xác định số lượng vi khuẩn đường ruột ở lợn con | 56 |
| 3.2.1. Kết quả xác định số lượng vi khuẩn hiếu khí, <i>Salmonella spp.</i> và <i>E. coli</i> ở lợn con | 55 |
| 3.2.2. Kết quả xác định số lượng vi khuẩn yếm khí và <i>Cl. perfringens</i> ở lợn con | 59 |
| 3.3. Kết quả phân lập vi khuẩn <i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> và <i>Cl. perfringens</i> ở lợn con | 63 |
| 3.4. Kết quả xác định một số đặc tính sinh hoá của các chủng vi khuẩn phân lập được ở lợn con tiêu chảy | 67 |
| 3.4.1. Kết quả xác định một số đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> | 67 |
| 3.4.2. Kết quả xác định một số đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn <i>Salmonella spp.</i> | 68 |
| 3.4.3. Kết quả xác định một số đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn <i>Cl. perfringens</i> | 70 |
| 3.5. Kết quả xác định type của các chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> và <i>Cl. perfringens</i> phân lập được ở lợn con tiêu chảy | 71 |

| | |
|---|------------|
| 3.5.1. Kết quả xác định type của các chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> | 71 |
| 3.5.2. Kết quả xác định type của các chủng vi khuẩn <i>Salmonella spp.</i> | 72 |
| 3.5.3. Kết quả xác định type của các chủng vi khuẩn <i>Cl. perfringens</i> | 75 |
| 3.6. Kết quả xác định khả năng dung huyết của các chủng <i>E. coli</i> phân lập được ở lợn con tiêu chảy | 77 |
| 3.7. Kết quả xác định kháng nguyên bám dính của <i>E. coli</i> và <i>Salmonella</i> <i>spp.</i> phân lập được từ lợn con tiêu chảy | 78 |
| 3.8. Kết quả xác định độc lực và độc tố của các chủng vi khuẩn phân lập được ở lợn con tiêu chảy | 80 |
| 3.8.1. Kết quả xác định các yếu tố gây bệnh của các chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> phân lập được | 82 |
| 3.8.2. Kết quả xác định độc lực của vi khuẩn <i>Salmonella spp.</i> phân lập được ở lợn con tiêu chảy | 87 |
| 3.8.3. Kết quả xác định độc lực của vi khuẩn <i>Cl. perfringens</i> phân lập được ở lợn con tiêu chảy | 91 |
| 3.9. Kết quả xác định khả năng miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn phân lập được | 93 |
| 3.9.1. Kết quả xác định khả năng miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> phân lập được | 95 |
| 3.9.2. Kết quả xác định khả năng miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn <i>Salmonella spp.</i> phân lập được | 97 |
| 3.9.3. Kết quả xác định khả năng miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn <i>Cl. perfringens</i> phân lập được | 99 |
| 3.10. Kết quả phòng và điều trị hội chứng tiêu chảy ở lợn con | 98 |
| 3.10.1. Kết quả đánh giá bước đầu về chế tạo thử nghiệm autovacxin đa giá.. | 100 |
| 3.10.2. Kết quả kiểm tra an toàn và hiệu lực của autovacxin trên động vật thí nghiệm | 102 |
| KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ | 116 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | |
| PHỤ LỤC | |

DANH MỤC CÁC BẢNG

| | |
|--|----|
| <i>Bảng 3.1:</i> Tỷ lệ lợn con tiêu chảy và chết tại một số địa điểm thuộc các tỉnh nghiên cứu | 52 |
| <i>Bảng 3.2:</i> Tỷ lệ lợn con mắc tiêu chảy và chết qua các năm | 53 |
| <i>Bảng 3.3:</i> Tỷ lệ lợn con bị tiêu chảy ở các lứa tuổi | 54 |
| <i>Bảng 3.4:</i> Tỷ lệ lợn con chết do tiêu chảy ở các lứa tuổi | 55 |
| <i>Bảng 3.5:</i> Kết quả xác định số lượng vi khuẩn hiếu khí, <i>Salmonella spp.</i> và <i>E. coli</i> / gam phân ở lợn con | 56 |
| <i>Bảng 3.6:</i> Kết quả xác định số lượng vi khuẩn yếm khí và <i>Cl. perfringens</i> / gam phân ở lợn con | 60 |
| <i>Bảng 3.7:</i> Tỷ lệ phân lập một số vi khuẩn trong phân lợn con | 62 |
| <i>Bảng 3.8:</i> Tỷ lệ phân lập một số vi khuẩn từ phủ tạng lợn con chết do tiêu chảy | 65 |
| <i>Bảng 3.9:</i> Đặc tính sinh hoá của các chủng <i>E. coli</i> phân lập được ở lợn con tiêu chảy | 68 |
| <i>Bảng 3.10:</i> Đặc tính sinh hoá của các chủng vi khuẩn <i>Salmonella spp.</i> phân lập được ở lợn con tiêu chảy | 69 |
| <i>Bảng 3.11:</i> Đặc tính sinh hoá của các chủng vi khuẩn <i>Cl. perfringens</i> phân lập được ở lợn con tiêu chảy | 70 |
| <i>Bảng 3.12:</i> Kết quả xác định serotype kháng nguyên O của các chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> phân lập được | 71 |
| <i>Bảng 3.13:</i> Kết quả xác định serotype vi khuẩn <i>Salmonella spp.</i> phân lập ở lợn con tiêu chảy | 73 |
| <i>Bảng 3.14:</i> Kết quả xác định type của các chủng vi khuẩn <i>Cl. perfringens</i> | 77 |
| <i>Bảng 3.15:</i> Kết quả xác định khả năng dung huyết của các chủng <i>E. coli</i> phân lập ở lợn con tiêu chảy | 79 |
| <i>Bảng 3.16:</i> Kết quả phản ứng ngưng kết trực tiếp hồng cầu của các chủng <i>E. coli</i> phân lập ở lợn con tiêu chảy | 80 |

| | |
|--|-----|
| <i>Bảng 3.17:</i> Kết quả phản ứng ngưng kết hồng cầu của các chủng vi khuẩn <i>Salmonella spp.</i> phân lập ở lợn con tiêu chảy | 81 |
| <i>Bảng 3.18:</i> Kết quả xác định các yếu tố gây bệnh của các chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> | 83 |
| <i>Bảng 3.19:</i> Kết quả kiểm tra độc lực của một số chủng <i>E. coli</i> trên chuột bạch | 86 |
| <i>Bảng 3.20:</i> Kết quả kiểm tra độc lực của một số chủng vi khuẩn <i>Salmonella spp.</i> trên chuột bạch | 88 |
| <i>Bảng 3.21:</i> Kết quả xác định độc tố của các chủng vi khuẩn <i>Salmonella spp.</i> phân lập được ở lợn con tiêu chảy | 90 |
| <i>Bảng 3.22:</i> Kết quả kiểm tra độc lực của một số chủng vi khuẩn <i>Cl. perfringens</i> trên chuột bạch..... | 92 |
| <i>Bảng 3.23:</i> Kết quả xác định độc tố đường ruột của các chủng vi khuẩn <i>Cl. perfringens</i> phân lập được ở lợn con tiêu chảy | 94 |
| <i>Bảng 3.24:</i> Kết quả xác định khả năng miễn cảm với kháng sinh của các chủng <i>E. coli</i> phân lập được | 95 |
| <i>Bảng 3.25:</i> Kết quả xác định khả năng miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn <i>Salmonella spp.</i> phân lập được | 98 |
| <i>Bảng 3.26:</i> Kết quả xác định khả năng miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn <i>Cl. perfringens</i> phân lập được | 99 |
| <i>Bảng 3.27:</i> Kết quả kiểm tra một số chỉ tiêu các lô autovacxin | 102 |
| <i>Bảng 3.28:</i> Kết quả thử hiệu lực của autovacxin trên chuột nhắt trắng | 104 |
| <i>Bảng 3.29:</i> Kết quả thử an toàn ở lợn sau khi tiêm chế phẩm autovacxin | 105 |
| <i>Bảng 3.30:</i> Kết quả khảo sát hiệu giá kháng thể ở lợn thí nghiệm sau khi tiêm autovacxin | 107 |
| <i>Bảng 3.31:</i> Kết quả bảo hộ lợn thí nghiệm bằng autovacxin | 109 |
| <i>Bảng 3.32:</i> Kết quả thử nghiệm liều và số lần tiêm autovacxin cho lợn | 110 |
| <i>Bảng 3.33:</i> Kết quả thử hiệu lực của autovacxin trên chuột nhắt trắng | 113 |
| <i>Bảng 3.34:</i> Kết quả điều trị tiêu chảy ở lợn con | 114 |

DANH MỤC CÁC SƠ ĐỒ VÀ HÌNH

| | |
|---|----|
| <i>Sơ đồ 1: Phân lập và giám định E. coli</i> | 40 |
| <i>Sơ đồ 2: Phân lập và giám định Salmonella</i> | 41 |
| <i>Sơ đồ 3: Phân lập và giám định vi khuẩn Clostridium</i> | 42 |
| <i>Sơ đồ 4: Quy trình sản xuất vaccin vô hoạt bổ trợ keo phèn</i> | 50 |
| <i>Hình 3.1. Biểu đồ tỷ lệ phân lập một số vi khuẩn trong phân lợn con</i> | 63 |
| <i>Hình 3.2. Biểu đồ phân lập một số vi khuẩn từ phủ tạng lợn con chết do tiêu chảy</i> | 64 |
| <i>Hình 3.3. Biểu đồ kết quả xác định serotype kháng nguyên O của các chủng vi khuẩn E.coli phân lập được</i> | 72 |
| <i>Hình 3.4. Biểu đồ kết quả xác định serotype của vi khuẩn Sanmonella phân lập được ở lợn con tiêu chảy</i> | 74 |
| <i>Hình 3.5. Biểu đồ kết quả xác định serotype của vi khuẩn Cl.perfringens phân lập được ở lợn con tiêu chảy</i> | 75 |
| <i>Hình 3.6. Kết quả PCR xác định yếu tố gây bệnh của vi khuẩn E. coli phân lập được</i> | 76 |
| <i>Hình 3.7. Biểu đồ tỷ lệ các chủng vi khuẩn E. coli mang các gen quy định các yếu tố gây bệnh trên chuột bạch</i> | 78 |
| <i>Hình 3.8. Biểu đồ tỷ lệ các chủng vi khuẩn E. coli mang các gen quy định các yếu tố gây bệnh</i> | 83 |