

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM

PHẠM THỊ PHƯƠNG LAN

Tên đề tài:

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH MỘT SỐ YẾU TỐ GÂY BỆNH
CỦA VI KHUẨN *Pasteurella multocida* TRONG BỆNH TỤ
HUYẾT TRÙNG TRÂU, BÒ TẠI HÀ GIANG, CAO BẰNG
VÀ LỰA CHỌN VẮC XIN PHÒNG BỆNH

LUẬN ÁN TIẾN SĨ THÚ Y

Thái Nguyên, năm 2017

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM

PHẠM THỊ PHƯƠNG LAN

Tên đề tài:

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH MỘT SỐ YẾU TỐ GÂY BỆNH
CỦA VI KHUẨN *Pasteurella multocida* TRONG BỆNH TỤ
HUYẾT TRÙNG TRÂU, BÒ TẠI HÀ GIANG, CAO BẰNG
VÀ LỰA CHỌN VẮC XIN PHÒNG BỆNH

Ngành: Ký sinh trùng và Vi sinh vật học thú y
Mã số: 9.64.01.04

LUẬN ÁN TIẾN SĨ THÚ Y

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Đặng Xuân Bình
2. TS. Nguyễn Ngọc Nhiên

Thái Nguyên, năm 2017

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan rằng đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi, các số liệu, kết quả trong luận án này là trung thực, không trùng lặp với những kết quả đã được công bố 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 và hoàn thành luận án đều đã được cảm ơn, các thông tin trích dẫn trong luận án đều đã được chỉ rõ nguồn gốc.

Thái Nguyên, tháng 10 năm 2017

Tác giả

Phạm Thị Phương Lan

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, tôi đã nhận được sự quan tâm giúp đỡ của nhiều tổ chức, cá nhân, của các thầy, các cô, các bạn đồng nghiệp và gia đình.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo và các thầy, cô của Đại học Thái Nguyên, phòng Đào tạo, khoa Chăn nuôi Thú y, trường Đại học Nông Lâm đã trực tiếp giảng dạy tôi trong suốt thời gian học tập.

Tôi xin trân trọng cảm ơn tập thể cán bộ khoa Chăn nuôi Thú y, trường Đại học Nông Lâm; Bộ môn vi trùng - Viện Thú y; Bộ môn vi trùng – Trung tâm chẩn đoán Thú y Trung ương đã nhiệt tình giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi nhất để tôi hoàn thành đề tài nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ nhiệt tình của các cán bộ Chi cục Thú y tỉnh Cao Bằng và Chi cục Thú y tỉnh Hà Giang đã hết sức tạo điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình thí nghiệm và thực hiện luận văn này.

Đặc biệt, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến các thầy hướng dẫn khoa học: PGS.TS Đặng Xuân Bình trường Đại học Nông Lâm và TS. Nguyễn Ngọc Nhiên Bộ môn Vi trùng – Viện Thú y đã trực tiếp hướng dẫn, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài và hoàn thành luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành tới các thầy cô giáo, các anh, chị, em – Viện Thú y Quốc gia đã trực tiếp hướng dẫn tôi thực hiện thí nghiệm, đóng góp những ý kiến quý báu, cùng những kinh nghiệm nghiên cứu để tôi hoàn thiện đề tài nghiên cứu.

Tôi luôn biết ơn gia đình, bạn bè và các đồng nghiệp đã giúp đỡ, động viên, hỗ trợ tôi trong suốt thời gian qua.

Tôi xin chân thành cảm ơn./.

Thái Nguyên, tháng 10 năm 2017

Tác giả

Phạm Thị Phương Lan

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC CỤM TỪ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH	x
MỞ ĐẦU	1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Vi khuẩn <i>Pasteurella multocida</i>	4
1.1.1. Phân loại vi khuẩn	4
1.1.3. Đặc tính sinh hóa	7
1.1.4. Các yếu tố gây bệnh của vi khuẩn <i>P. multocida</i>	7
1.2. Bệnh tụ huyết trùng do vi khuẩn <i>P. multocida</i> gây ra.....	18
1.2.1. Đặc điểm bệnh tụ huyết trùng trâu, bò	18
1.2.2. Cơ chế sinh bệnh.....	18
1.2.3. Đặc điểm dịch tễ học	19
1.2.4. Triệu chứng lâm sàng và bệnh tích bệnh tụ huyết trùng trâu, bò	23
1.2.5. Chẩn đoán bệnh	25
1.2.6. Phòng và trị bệnh tụ huyết trùng.....	32
1.3. Vắc xin phòng bệnh tụ huyết trùng	35
1.3.1. Trên thế giới.....	35
1.3.2. Ở Việt Nam.....	38
1.4. Một số kết luận qua phân tích tổng quan.....	40
Chương 2: NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	42
2.1. Đối tượng, phạm vi nghiên cứu.....	42
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	42
2.1.2. Nguyên vật liệu.....	42
2.1.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu.....	44
2.2. Nội dung nghiên cứu	44
2.2.1. Nghiên cứu điều tra về dịch tễ bệnh tụ huyết trùng trâu, bò tại 2 tỉnh Hà Giang và Cao bằng	44
2.2.2. Nghiên cứu phân lập và xác định các đặc tính sinh vật, hóa học, yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn <i>P. multocida</i> phân lập được.....	45

2.2.3. Xác định miễn dịch chủ động tự nhiên và đánh giá hiệu lực của vắc xin P52 dạng keo phen và nhũ dầu trong phòng bệnh tụ huyết trùng cho trâu, bò tại 2 tỉnh Hà Giang, Cao Bằng.....	45
2.3. Phương pháp nghiên cứu	46
2.3.1. Phương pháp nghiên cứu dịch tễ học bệnh tụ huyết trùng trâu, bò	46
2.3.2. Phương pháp lấy mẫu	49
2.3.3. Phương pháp phân lập vi khuẩn <i>P. multocida</i>	49
2.3.4. Phương pháp xác định đặc tính sinh vật, hóa học của <i>P. multocida</i>	51
2.3.5. Phương pháp xác định serotype của vi khuẩn <i>P. multocida</i> phân lập được từ trâu, bò chết nghi mắc bệnh tụ huyết trùng bằng kỹ thuật PCR.....	51
2.3.6. Phương pháp xác định LD ₅₀ của vi khuẩn <i>P. multocida</i> phân lập được từ trâu, bò chết nghi mắc bệnh tụ huyết trùng tại Hà Giang và Cao Bằng	52
2.3.7. Phương pháp xác định độc lực của vi khuẩn <i>P. multocida</i> phân lập được từ trâu, bò chết nghi mắc bệnh tụ huyết trùng đối với chuột nhắt trắng (Carter và cs, 1995) [77].....	53
2.3.8. Phương pháp xác định mức độ miễn cảm với một số kháng sinh của các chủng <i>P. multocida</i> phân lập được (Nguyễn Thanh Hà, 1991) [10].	53
2.3.9. Kiểm tra đáp ứng miễn dịch của trâu, bò sau khi tiêm vắc xin	54
2.3.10. Phương pháp xác định hiệu giá kháng thể trong huyết thanh của trâu, bò trước khi tiêm vắc xin và sau khi tiêm vắc xin bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu gián tiếp IHA (Indirect Haemagglutination Test).	55
2.3.11. Phương pháp xác định hiệu lực bảo hộ đối với trâu, bò trước và sau khi tiêm phòng vắc xin bằng phương pháp bảo hộ thụ động chuột nhắt trắng (Bain và cs, 1982) [61].....	56
2.3.12. Phương pháp đánh giá tỷ lệ bảo hộ trung bình (Lê Văn Tạo, Dương Thế Long, 1996) [42]	58
2.3.13. Phương pháp xử lý số liệu	58
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	59
3.1. Nghiên cứu điều tra về dịch tễ bệnh tụ huyết trùng trâu, bò tại 2 tỉnh Hà Giang và Cao Bằng từ năm 2011 - 2015.....	59
3.1.1. Tỷ lệ trâu, bò mắc bệnh và tử vong do tụ huyết trùng tại tỉnh Hà Giang và Cao Bằng.....	59
3.1.2. Tỷ lệ mắc bệnh và tử vong do tụ huyết trùng xét riêng ở từng loài trâu, bò tại 2 tỉnh Hà Giang và Cao Bằng.....	61

3.1.3. Tỷ lệ trâu, bò mắc tụ huyết trùng và tử vong ở các mùa vụ trong năm tại 2 tỉnh Hà Giang và Cao Bằng	63
3.1.4. Mức độ dịch và hệ số năm dịch đối với bệnh tụ huyết trùng trâu, bò tại 2 tỉnh Hà Giang và Cao Bằng	66
3.1.5. Thời điểm phát dịch, mùa dịch đối với bệnh tụ huyết trùng trâu, bò tại 2 tỉnh Hà Giang và Cao Bằng	67
3.2. Nghiên cứu phân lập và xác định các đặc tính sinh vật, hóa học, yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn <i>P. multocida</i> phân lập được	70
3.2.1. Phân lập vi khuẩn <i>P. multocida</i> từ dịch ngoáy mũi của trâu, bò khoẻ tại 2 tỉnh Hà Giang và Cao Bằng	70
3.2.2. Phân lập vi khuẩn <i>P. multocida</i> từ bệnh phẩm trâu, bò nghi mắc bệnh tụ huyết trùng tại Hà Giang và Cao Bằng	72
3.2.3. Giám định một số đặc tính sinh vật, hoá học của các chủng vi khuẩn <i>P. multocida</i> phân lập được	73
3.2.4. Xác định serotype các chủng vi khuẩn <i>P. multocida</i> phân lập được bằng phản ứng PCR	76
3.2.5. Xác định độc lực của các chủng vi khuẩn <i>P. multocida</i> phân lập được ..	78
3.2.6. Xác định LD ₅₀ của vi khuẩn <i>P. multocida</i>	83
3.2.7. Kiểm tra khả năng miễn cảm của các chủng vi khuẩn <i>P. multocida</i> phân lập được với một số loại kháng sinh và hóa dược	85
3.3. Xác định miễn dịch chủ động tự nhiên và đánh giá hiệu lực của vắc xin P52 dạng keo phen và nhũ dầu trong phòng bệnh tụ huyết trùng cho trâu, bò tại 2 tỉnh Hà Giang, Cao Bằng.	88
3.3.1. Miễn dịch chủ động tự nhiên ở trâu, bò chưa được tiêm phòng vắc xin trong vùng thường xuyên xảy ra dịch tụ huyết trùng địa phương	88
3.3.2. Kiểm tra đáp ứng miễn dịch của trâu, bò sau khi tiêm vắc xin tụ huyết trùng chủng P52 bằng phương pháp ngưng kết hồng cầu gián tiếp.	94
3.3.3. Kiểm tra hiệu lực vắc xin tụ huyết trùng đối với trâu, bò được tiêm phòng bằng phương pháp bảo hộ thụ động chuột nhắt trắng.	108
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	124
TÀI LIỆU THAM KHẢO	127

DANH MỤC CÁC CỤM TỪ VIẾT TẮT

AGPT	: Agar Gel Precipitin Test (Phản ứng kết tủa trên thạch)
DNA	: Deoxyribonucleic acid
BHI	: Brain Heart Infusion (Môi trường thạch BHI)
CFU	: Colony forming units (Đơn vị khuẩn lạc)
CSY	: Casein-sucrose-yeast (Môi trường thạch CSY)
CBPT7	: Chứng <i>P. multocida</i> phân lập tại Cao Bằng
cs	: Cộng sự
DNT	: Dermonecrotic toxin (Độc tố gây hoại tử)
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Phương pháp ELISA)
FAO	: Food and Agriculture Organization (Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hiệp Quốc)
GMT	: Geometric Mean Titer (Hiệu giá trung bình)
HE	: Hemtoxylin Eosin (Phương pháp nhuộm HE)
HS	: Haemorrhagic septicaemia (Nhiễm trùng huyết, xuất huyết)
HGXB5	: Chứng <i>P. multocida</i> phân lập tại Hà Giang
HSND	: Hệ số năm dịch
HSTD	: Hệ số tháng dịch
IHA	: Indirect Haemagglunation Tets (Phản ứng ngưng kết hồng cầu gián tiếp)
LD50	: Lethal Dose 50 – Liều gây chết 50%
MAT	: Microscopic Agglutination Test (Xét nghiệm huyết thanh học MAT)
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards (Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm)
OMP	: Outer membrane protein (Protein màng ngoài)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Phản ứng nhân gen)
PMPT	: Passive Mouse Protection Test (Phương pháp bảo hộ thụ động trên chuột)
<i>P. multocida</i>	: <i>Pasteurella multocida</i>
REP-PCR	: Repetitive extragenic palindrome (Nhân các đoạn gen lặp lại bằng kỹ thuật PCR)
RR	: Relative Risk (nguy cơ tương đối RR)
SDS	: Sodium dodiclyl sulphate
TEM	: Transport enrichment medium (Môi trường vận chuyển)
TSI	: Triple Sugar Iron (Môi trường 3 đường)
THT	: Tụ huyết trùng

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Sự tương quan giữa các type của Roberts và Carter.....	14
Bảng 1.2. Hệ thống phân loại <i>serotype P. multocida</i>	16
Bảng 2.1. Trình tự cặp môi dùng để xác định serotype B của vi khuẩn <i>P. multocida</i>	51
Bảng 2.2. Thành phần các chất trong phản ứng PCR	52
Bảng 2.3. Đánh giá mức độ miễn cảm của vi khuẩn với một số loại kháng sinh (NCCLS – 2014) [126]	54
Bảng 2.4. Bố trí thí nghiệm xác định hiệu lực bảo hộ của trâu, bò trước khi tiêm phòng vắc xin	57
Bảng 2.5. Bố trí thí nghiệm xác định hiệu lực bảo hộ của trâu, bò sau khi tiêm phòng vắc xin	58
Bảng 3.1. Tỷ lệ trâu, bò mắc bệnh và tử vong do tụ huyết trùng.....	59
Bảng 3.2. Tỷ lệ mắc bệnh và tử vong do tụ huyết trùng xét riêng ở từng loài trâu, bò	61
Bảng 3.3. Tỷ lệ trâu, bò mắc tụ huyết trùng và tử vong ở các mùa vụ	63
Bảng 3.4. Hệ số năm dịch bệnh tụ huyết trùng trâu, bò tại Hà Giang và Cao Bằng	66
Bảng 3.5. Hệ số tháng dịch bệnh tụ huyết trùng trâu, bò tại 2 tỉnh Hà Giang và Cao Bằng	68
Bảng 3.6. Phân lập vi khuẩn <i>P. multocida</i> từ dịch ngoáy mũi trâu, bò khỏe.....	70
Bảng 3.7. Phân lập vi khuẩn <i>P. multocida</i> từ mẫu bệnh phẩm trâu, bò nghi mắc bệnh tụ huyết trùng	72
Bảng 3.8. Giám định một số đặc tính sinh vật, hoá học của các chủng vi khuẩn <i>P. multocida</i> phân lập được	74
Bảng 3.9. Kết quả thử phản ứng lên men đường của các chủng vi khuẩn <i>P. multocida</i> phân lập được.....	75
Bảng 3.10. Xác định serotype các chủng vi khuẩn <i>P. multocida</i> phân lập được bằng phản ứng PCR.....	77
Bảng 3.11. Xác định độc lực của các chủng vi khuẩn <i>P. multocida</i> phân lập được.....	79
Bảng 3.12. Dung quang khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn <i>P. multocida</i> phân lập được.....	81
Bảng 3.13. LD50 của vi khuẩn <i>P. multocida</i>	84

Bảng 3.14. Kiểm tra khả năng miễn cảm với một số loại kháng sinh của.....	86
Bảng 3.15. Kiểm tra hiệu giá kháng thể kháng tụ huyết trùng trong huyết thanh của trâu, bò chưa được tiêm phòng vắc xin.....	88
Bảng 3.16. Kiểm tra đáp ứng miễn dịch của trâu, bò chưa tiêm vắc xin phòng bệnh tụ huyết trùng bằng phương pháp bảo hộ thụ động chuột nhắt trắng.....	90
Bảng 3.17. Điều tra tình hình tiêm phòng vắc xin tụ huyết trùng trâu, bò tại Hà Giang và Cao Bằng.....	92
Bảng 3.18. Kiểm tra hiệu giá kháng thể trong huyết thanh trâu, bò tại thời điểm 1 tháng sau tiêm vắc xin phòng bệnh tụ huyết trùng.....	95
Bảng 3.19. Kiểm tra hiệu giá kháng thể trong huyết thanh trâu, bò tại thời điểm 3 tháng sau tiêm vắc xin phòng bệnh tụ huyết trùng.....	99
Bảng 3.20. Kiểm tra hiệu giá kháng thể trong huyết thanh trâu, bò tại thời điểm 6 tháng sau khi tiêm vắc xin tụ huyết trùng.....	101
Bảng 3.21. Tổng hợp kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong huyết thanh trâu, bò đối với từng loại vắc xin tại các thời điểm 1, 3, và 6 tháng sau tiêm phòng.....	103
Bảng 3.22. Kiểm tra hiệu giá kháng thể trong huyết thanh trâu, bò sau khi tiêm vắc xin tụ huyết trùng nhũ dầu.....	106
Bảng 3.23. Tổng hợp kết quả kiểm tra hiệu giá kháng thể trong huyết thanh trâu, bò đối với vắc xin tụ huyết trùng nhũ dầu tại thời điểm 9 và 12 tháng sau tiêm phòng.....	107
Bảng 3.24. Kiểm tra hiệu lực vắc xin tụ huyết trùng đối với trâu, bò sau tiêm 1 tháng bằng phương pháp bảo hộ thụ động chuột nhắt trắng.....	109
Bảng 3.25. Kiểm tra hiệu lực vắc xin tụ huyết trùng đối với trâu, bò sau tiêm 3 tháng bằng phương pháp bảo hộ thụ động chuột nhắt trắng.....	111
Bảng 3.26. Kiểm tra hiệu lực vắc xin tụ huyết trùng đối với trâu, bò sau tiêm 6 tháng bằng phương pháp bảo hộ thụ động chuột nhắt trắng.....	113
Bảng 3.27. Kiểm tra hiệu lực vắc xin tụ huyết trùng nhũ dầu đối với trâu, bò sau tiêm 9 và 12 tháng bằng phương pháp bảo hộ thụ động chuột nhắt trắng.....	115
Bảng 3.28. Tổng hợp kết quả kiểm tra hiệu lực vắc xin tụ huyết trùng nhũ dầu chủng P52 đối với trâu, bò sau khi tiêm tại thời điểm 1, 3 và 6 tháng bằng phương pháp bảo hộ thụ động chuột nhắt trắng.....	117