

BỘ GIAO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT

VIỆN THÚ Y

NGUYỄN THỊ LIÊN HƯƠNG

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA VI KHUẨN
CHERICHIA COLI PHÂN LẬP TỪ NGAN BỆNH VÀ BIỆN
PHÁP PHÒNG TRỊ**

Chuyên ngành: Vi sinh vật học thú y

Mã số : 62. 62. 50. 10

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ NÔNG NGHIỆP

CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI VIỆN THÚ Y

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS. CÙ HỮU PHÚ

2. TS. ĐỖ NGỌC THÚY

Phản biện 1:

GS. TS. Nguyễn Như Thanh

Phản biện 2:

PGS. TS. Hoàng Đạo Phần

Phản biện 3:

PGS. TS. Phạm Ngọc Thạch

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp Viện

Họp tại: Viện Thú y Quốc gia

Có thể tìm luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam

- Thư viện Viện Thú y Quốc gia

- Thư viện Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Thụy Phương

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN CỦA TÁC GIẢ

1. **Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Thị Liên Hương**. *Nghiên cứu biện pháp phòng trị bệnh do E. coli và Salmonella gây ra cho ngan Pháp*. Tuyển tập công trình nghiên cứu Khoa học- Công nghệ chăn nuôi ngan, ngỗng. NXB Nông nghiệp, 2004. Trang 197 – 203.
2. **Đỗ Ngọc Thúy, Nguyễn Thị Liên Hương, Lê Thị Minh Hằng, Trần Việt Dũng Kiên**. Một số đặc tính của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ ngan mắc Colibacillosis. *Tạp chí Khoa học và Kỹ thuật Thú y*. Tập XVI, số 4. 2009. Trang 32-38.
3. **Nguyễn Thị Liên Hương, Cù Hữu Phú, Đỗ Ngọc Thúy, Lê Minh Hằng, Trần Việt Dũng Kiên**. Tỷ lệ phân lập và khả năng miễn cảm kháng sinh của các chủng *E. coli* phân lập từ ngan mắc bệnh trực khuẩn coli. *Tạp chí Khoa học và Kỹ thuật Thú y*. Tập XVI, số 6. 2009. Trang 20-24.
4. **Nguyễn Thị Liên Hương, Đỗ Ngọc Thúy, Lê Thị Minh Hằng**. Kết quả gây nhiễm thử nghiệm một số chủng vi khuẩn *E. coli* gây bệnh cho ngan trên phôi trứng. *Tạp chí Khoa học và Kỹ thuật Thú y*. Tập XVI, số 2. 2010. Trang 58- 63.
5. **Nguyễn Thị Liên Hương, Cù Hữu Phú, Đỗ Ngọc Thúy, Lê Thị Minh Hằng**. Tình hình nhiễm và một số đặc điểm của Colibacillosis ở ngan nuôi tại Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Kỹ thuật Thú y*. Tập XVI, số 3. 2010.
6. **Đỗ Ngọc Thúy, Nguyễn Thị Liên Hương, Lê Thị Minh Hằng, Trần Việt Dũng Kiên**. Xác định một số gen liên quan đến của vi khuẩn *E. coli* gây bệnh cho ngan bằng phương pháp PCR. *Tạp chí Khoa học và Kỹ thuật Thú y*. Tập XVI, số 3. 2010.
7. **D. N. Thuy, N. T. L. Huong, C. H. Phu, L. T. M. Hang, T. V. D. Kien**. 2010. Characterization of pathogenic *E. coli* associated with Colibacillosis in muscovy ducks in VietNam. *Proceedings of the 14th Animal Science Congress of the Asian – Australasian association of animal production societies*. August 23- 27, 2010. Pingtung , Taiwan , ROC. p. 467.

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

APEC	: Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i>
BG	: Brilliant Green
BHI	: Brain Heart Infusion
bp	: Base pair
CR	: Congo Red
cs	: Cộng sự
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
dNTP	: Deoxyribonucleotide triphosphate
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ELISA	: Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay
EMB	: Eosin Methylen Blue
ETEC	: Enterotoxigenic <i>E.coli</i>
LT	: Labile Heat Toxin
MRHA	: Mannose Resistance Haemagglutination
MSHA	: Mannose Sensitive Haemagglutination
NCCLS	: National Committee of Clinical Laboratory Standards
NXB	: Nhà xuất bản
µl	: Microlitre
OMPs	: Outer Membrane Proteins
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RBC	: Red blood cell
rpm	: Revolutions per minute
SĐK	: Sức đề kháng
SIM	: Sulfide – Indole - Motility
SL	: Số lượng
ST	: Stable Heat Toxin
TSB	: Tryptose Soy Broth
VK	: Vi khuẩn
TAE	: Tris - Acetate - EDTA
TE	: Tris - EDTA
w/v	: Weight/volume

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của đề tài

Trong chăn nuôi ngan, các bệnh do vi khuẩn gây nên thường xuyên xảy ra, như Pasteurellosis, Salmonellosis, Colibacillosis, Mycoplasmosis...., trong đó, Colibacillosis do vi khuẩn *E. coli* gây ra (hay còn gọi là bệnh trực khuẩn *E. coli*) là phổ biến nhất, gặp ở mọi nơi, mọi lứa tuổi của ngan, đặc biệt ở những nơi có điều kiện chăn nuôi không hợp lý, công tác vệ sinh thú y kém, nuôi với mật độ đông, chuồng trại ẩm thấp hoặc có nhiều yếu tố bất lợi ảnh hưởng đến sức khỏe đàn ngan, khi đó bệnh phát sinh và gây thiệt hại đáng kể về kinh tế.

Trên thế giới cũng như ở Việt Nam, đã có rất nhiều công trình nghiên cứu về vi khuẩn *E. coli* gây bệnh cho vật nuôi. Tuy nhiên, vi khuẩn *E. coli* gây bệnh cho gia cầm có các đặc tính không hoàn toàn giống với các chủng gây bệnh cho người và động vật có vú (Delicato và cs, 2003). Ở Việt Nam, các công trình nghiên cứu về vi khuẩn *E. coli* gây bệnh cho gia cầm còn rất hạn chế, đặc biệt là vi khuẩn *E. coli* gây bệnh trên ngan, vẫn chưa có công trình nghiên cứu nào được công bố. Để có thêm hiểu biết về căn nguyên gây bệnh này nhằm phục vụ công tác phòng và trị bệnh có hiệu quả, chúng tôi đã tiến hành đề tài: ***“Nghiên cứu một số đặc tính của vi khuẩn *Escherichia coli* phân lập từ ngan bệnh và biện pháp phòng, trị”***

Mục tiêu của đề tài

Xác định một số đặc tính của vi khuẩn *Escherichia coli* gây bệnh trên ngan và biện pháp phòng trị bệnh.

Ý nghĩa của đề tài

❖ Ý NGHĨA KHOA HỌC CỦA ĐỀ TÀI

- Đây là nghiên cứu khá đầy đủ về một số đặc điểm của Colibacillosis trên ngan, đặc tính sinh học, vai trò của vi khuẩn *E. coli* gây bệnh trên ngan và

biện pháp phòng trị bệnh.

- Là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam đã xác định được một số khác biệt về kháng nguyên, yếu tố gây bệnh của các chủng vi khuẩn *Escherichia coli* phân lập từ gan bệnh và gan khỏe.

- Kết quả nghiên cứu và thông tin sử dụng trong luận án có thể là tài liệu tham khảo cho giảng dạy và nghiên cứu về Colibacillosis trên gan; đặc tính sinh học, vai trò của vi khuẩn *E. coli* gây bệnh trên gan và biện pháp phòng trị bệnh.

❖ Ý NGHĨA THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

- Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học giúp chẩn đoán chính xác Colibacillosis trên gan

- Dựa vào kết quả nghiên cứu, giúp đề xuất các giải pháp có hiệu quả cao trong phòng và trị Colibacillosis trên gan

❖ NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA ĐỀ TÀI

- Lần đầu tiên đã xác định sự khác biệt về serotyp và một số yếu tố gây bệnh (bằng PCR) của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ gan bệnh và gan khỏe.

- Là nghiên cứu đầu tiên về khả năng gây bệnh trên các phôi gan, vịt và gà của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ gan.

Bố cục của luận án

Luận án chính gồm 138 trang, trong đó: Mở đầu (3 trang), tổng quan tài liệu (36 trang), nội dung, nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu (17 trang), kết quả nghiên cứu và thảo luận (61 trang), kết luận và đề nghị (2 trang), danh mục công trình công bố của tác giả (1 trang). Luận án có 32 bảng, 5 sơ đồ và biểu đồ, 40 hình ảnh, 146 tài liệu tham khảo (18 trang), gồm 29 tài liệu tiếng Việt, 116 tài liệu tiếng Anh và 1 tài liệu tiếng Đức.

PHẦN I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Một số nghiên cứu trên thế giới về Colibacillosis ở gia cầm

Bệnh truyền nhiễm ở gia cầm gây ra bởi vi khuẩn *E. coli* lần đầu tiên được David báo cáo năm 1938 và Twisselman năm 1939 (Gross, 1994) là một trong những bệnh thường gặp nhất và gây thiệt hại kinh tế đáng kể (Kikuyasu Nakamura, 2000; Ewers và cs, 2003). Bệnh làm tăng tỷ lệ chết, giảm năng suất và tăng tỷ lệ loại thải (Barnes và cs, 2003). Bệnh nguyên phát hoặc kế phát sau các bệnh nhiễm trùng khác hay vấn đề quản lý không tốt (Alastair Johnston, 2007). Ở gia cầm chủ yếu do các chủng *E. coli* thuộc nhóm gây bệnh cho gia cầm gây ra (APEC) (Gross, 1994; Dho-Moulin và Fairbrother, 1999; Vandekerchove và cs, 2005; Jordan và cs, 2005).

1.2. Colibacillosis ở gia cầm

Mặc dù vi khuẩn *E. coli* phát triển rộng rãi trong đường tiêu hóa và môi trường sống của gia cầm khỏe, nhưng chỉ những chủng mang các yếu tố độc lực mới có khả năng gây bệnh (Delicato và cs, 2003). Bệnh có thể xảy ra với tất cả các loài gia cầm, thường thấy ở gà, vịt, ngan, gà tây; gây tỷ lệ chết cao ở gia cầm con.

Mầm bệnh dù có sẵn trong cơ thể hay từ ngoài vào, đều xâm nhập vào hệ tuần hoàn và gây nhiễm trùng máu, theo máu đến các khí quan gây tổn thương như viêm túi khí (sacculitis), viêm bao tim (pericarditis), viêm màng gan (perihepatitis), viêm phúc mạc (peritonitis), viêm vòi trứng (salpingitis), viêm ruột (enteritis) ... (Dho-Moulin và Fairbrother, 1999), gây ra nhiều thể bệnh. Chẩn đoán bệnh dựa vào triệu chứng, bệnh tích và vi trùng học.

1.3. Một số đặc tính của vi khuẩn *E. coli* nói chung và các chủng gây bệnh ở gia cầm nói riêng

E. coli là trực khuẩn ngắn, hai đầu tròn, có kích thước 2 - 3 x 0,6 μm , bắt màu gram âm. Trực khuẩn hiếu khí hoặc hiếu khí tùy tiện, nhiệt độ

thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển là 37°C, pH thích hợp là 7,4. Vi khuẩn *E. coli* có khả năng lên men và sinh hơi đường glucose, fructose, galactose, lactose, manitol, levulose, xylose; làm đông vón sữa, không làm tan chảy gelatin, phản ứng Indol, catalase, MR dương tính; oxidase, VP, urease, H₂S âm tính; có khả năng khử nitrat thành nitrit.

Ở môi trường bên ngoài, các chủng *E. coli* gây bệnh có thể tồn tại đến 4 tháng (Gross, 1994). Vi khuẩn *E. coli* có khoảng 250 loại kháng nguyên O, 89 loại kháng nguyên K, 56 loại kháng nguyên H và một số quyết định kháng nguyên F (Fairbrother, 1992, Carter, 1995).

1.4. Một số nghiên cứu về vi khuẩn *E. coli* gây bệnh cho vật nuôi tại Việt Nam

Đã có rất nhiều các công trình nghiên cứu về vi khuẩn *E. coli* gây bệnh cho lợn, như các tác giả Nguyễn Thị Nội (1985); Lê Văn Tạo và cs (1993, 1996); Cù Hữu Phú (1999, 2004), Nguyễn Khả Ngự (2000); Lý Thị Liên Khai (2001); Bùi Xuân Đông (2002); Đỗ Ngọc Thuý và cs (2002); Trần Thị Hạnh và cs (2004); Trịnh Quang Tuyên và cs (2004); Trương Quang (2005)... Một số tác giả đã nghiên cứu về vi khuẩn *E. coli* gây bệnh trên bê, nghé, trâu bò như Nguyễn Văn Quang và cs (2002); Trương Quang và cs (2006); Vũ Khắc Hùng và cs (2007)... Nghiên cứu về vi khuẩn *E. coli* gây bệnh trên gà có tác giả Tô Minh Châu và cs (2002); Võ Thành Thìn và cs (2008a, b). Nghiên cứu về khả năng miễn cảm và kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* có các nghiên cứu của Phạm Khắc Hiếu và cs (1995, 1999); Đỗ Ngọc Thuý và cs (2002); Tô Liên Thu và cs (2004), ... Tuy nhiên, cho đến nay, vẫn chưa có một nghiên cứu nào về vi khuẩn *E. coli* gây bệnh trên ngan được tiến hành tại Việt Nam.

PHẦN II: NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

2.1.1. Xác định một số đặc điểm của Colibacillosis trên gan

- Đánh giá tình hình gan nghi mắc Colibacillosis
- Xác định tỷ lệ gan mắc nghi Colibacillosis theo lứa tuổi, mùa vụ
- Xác định một số triệu chứng và bệnh tích điển hình

2.1.2. Phân lập và xác định một số đặc tính sinh học của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được

- Phân lập và giám định vi khuẩn *E. coli* từ các mẫu bệnh phẩm
- Xác định một số đặc tính sinh học
- Xác định một số yếu tố gây bệnh của các chủng *E. coli* gồm: Yếu tố bám dính, khả năng thu nhận sắt, kháng bổ thể trong huyết thanh
- Xác định serotype, mối liên quan với tổ hợp của các yếu tố gây bệnh
- Gây nhiễm thực nghiệm các chủng *E. coli* trên phôi trứng
- Xác định khả năng miễn cảm với kháng sinh

2.1.3. Nghiên cứu biện pháp phòng trị Colibacillosis cho gan

- Biện pháp trị bệnh bằng kháng sinh
- Phòng bệnh bằng axit hữu cơ và chế phẩm sinh học

2.2. Nguyên liệu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu: Colibacillosis ở gan và vi khuẩn *E. coli* phân lập được từ gan bệnh, gan khỏe

2.2.2. Mẫu nghiên cứu: Các mẫu bệnh phẩm (tim, phổi, gan, lách, túi khí, ruột) của gan nghi mắc bệnh. Mẫu phân của gan khỏe

2.2.3. Phôi trứng thí nghiệm: Phôi trứng (gan, vịt, gà) khỏe mạnh, đang được ấp tương ứng ở 15, 13 và 9 ngày

2.2.4. Môi trường, hoá chất

- Các loại môi trường, hóa chất dùng để nuôi cấy, phân lập, bồi dưỡng, xác

định một số yếu tố độc lực của vi khuẩn *E. coli*; giấy tẩm kháng sinh; một số kháng sinh và chế phẩm dùng để phòng, trị thử nghiệm

- Các kháng huyết thanh O chuẩn (đa giá và đơn giá) (Denka - Nhật)

2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm: Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Thụy phương; các cơ sở nuôi ngan tại Sóc Sơn, Ba Vì, Hà Nam; bộ môn Vi trùng - Viện Thú Y.

- Thời gian: Từ năm 2007 đến năm 2010

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp chẩn đoán bệnh

- Chẩn đoán lâm sàng: dựa vào các biểu hiện về triệu chứng, bệnh tích

- Chẩn đoán phi lâm sàng: dựa vào các kết quả phân lập vi khuẩn

2.4.2. Phương pháp lấy mẫu: Bệnh phẩm (gồm tim, phổi, gan, lách, túi khí, ruột) của ngan nghi mắc Colibacillosis và mẫu phân của ngan khỏe được giữ ở 4°C và chuyển về phòng thí nghiệm trong thời gian từ 1-4 giờ.

2.4.3. Phương pháp phân lập và giám định vi khuẩn

Theo quy trình thường quy của Bộ môn Vi trùng - Viện Thú Y.

2.4.4. Phương pháp xác định một số yếu tố liên quan đến độc lực

- Xác định F1 fimbriae bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu (Jones & Rutter, 1974)

- Kiểm tra khả năng kháng bổ thể trong huyết thanh bằng phương pháp ức chế bổ thể và đo độ đục (Vandekerchove, 2005)

- Xác định một số yếu tố độc lực bằng phương pháp PCR (Delicato và cs, 2003; Vandekerchove và cs, 2005).

2.4.5. Phương pháp xác định serotyp kháng nguyên O của các chủng vi khuẩn phân lập được: bằng ngưng kết nhanh trên phiến kính (Sojka và cs, 1965).

2.4.6. Phương pháp xác định khả năng miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được: Bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và đánh giá kết quả theo Hội đồng quốc gia Hoa Kỳ (NCCLS) (1999).

Bảng 2.1. Ký hiệu chuỗi DNA của các cặp mồi dùng để xác định một số yếu tố độc lực của vi khuẩn APEC và kích cỡ của các sản phẩm sau quá trình điện di

Gen đích	Ký hiệu primers	Thứ tự chuỗi DNA	Kích cỡ sản phẩm (bp)	Yếu tố độc lực cần xác định
FimA	FimA-F	5'-GTT GAT CAA ACC GTT CAG-3'	331	F1 Fimbriae (protein chính)
	FimA-R	5'-AAT AAC GCG CCT GGA ACG-3'		
FimH	FimH-F	5' - TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG - 3'	508	F1 Fimbriae (tiểu phần bám dính)
	FimH-R	5' - GCA GTC ACC TGC CCT CCG TGG - 3'		
eae	eae-F	5' - ACG TTG CAG CAT GGG TAA CT - 3'	816	Protein Intimin (bám dính và xâm nhập)
	eae-R	5' - GAT CGG CAA CAG TTT CAC CTG - 3'		
PapC	PapC-F	5'-GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G -3'	328	P-Fimbriae operon
	PapC-R	5'-ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A -3'		
IutA	IutA-F	5' - GGC TGG ACA TGG GAA CTG G - 3'	300	Điểm tiếp nhận aerobactin
	IutA-R	5' - CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG - 3'		
IucA	IucA-F	5' - ATT ATG ATC CTG CCC TCT GA - 3'	821	Tổng hợp aerobactin
	IucA-R	5' - ATC GCG GCT GGT AGC ACA GTA GA - 3'		
Tsh	Tsh-F	5' - AAG TCT GTC AGA CGT CTG TGT T - 3'	478	Ngưng kết hồng cầu tố miễn cảm nhiệt độ
	Tsh-R	5' - GGA TAG CGC TCC TTA TCC AGA T - 3'		
Iss	Iss-F	5' - GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC - 3'	760	Tăng khả năng sống trong huyết thanh
	Iss-R	5' - CGC CTC GGG GTG GAT AA- 3'		
CvaC	CvaC-F	5' - TAT GAG AAC TCT GAC TCT AAA T - 3'	559	Gen cấu trúc của protein ColV
	CvaC-R	5' - ATT TAT AAA CAA ACA TCA CTA A - 3'		
Stx1	Stx1-F	5' - CAG TTA ATG TGG TGG CGA AG - 3'	894	Độc tố Shiga 1
	Stx2-R	5' - CTG CTA ATA GTT CTG CGC ATG - 3'		
Stx2	Stx2-F	5' - CTT CGG TAT CCT ATT CCC GG - 3'	481	Độc tố Shiga 2
	Stx2-R	5' - GGA TGC ATC TCT GGT CAT TG - 3'		
Cnf1	Cnf1-F	5' - AGG AAG TTA TAT TTC CGT AGG - 3'	498	Yếu tố gây độc và hoại tử tế bào loại 1
	Cnf1-R	5' - GTA TTT GCC TGA ACC GTA A - 3'		
Cnf2	Cnf2-F	5' - AAT CTA ATT AAA GAG AAC - 3'	543	Yếu tố gây độc và hoại tử tế bào loại 2
	Cnf2-R	5' - CAT GCT TTG TAT ATC TA - 3'		

2.4.7. Phương pháp kiểm tra độc lực trên phôi trứng

Gây nhiễm trên phôi theo phương pháp của Gibbs (2003): tiêm 0,2 ml canh trùng *E. coli* (~400-450 vi khuẩn/phôi) cần kiểm tra vào xoang niệu mô của các phôi ngan, vịt, gà; tiếp tục ấp, theo dõi và kiểm tra 2 lần/ngày về khả năng sống/chết. Các phôi chết được mổ khám, kiểm tra bệnh tích, phân lập vi khuẩn và giám định một số đặc tính.

2.4.8. Xác định số lượng vi khuẩn trong canh trùng nuôi cấy

Pha loãng canh trùng sau khi nuôi cấy theo cơ số 10 và đếm số khuẩn lạc trên mặt đĩa thạch máu sau khi đã ủ ở 37°C/24 giờ.

2.4.9. Phòng, trị bệnh cho ngan

Thử nghiệm một số phác đồ phòng và trị Colibacillosis trên ngan nuôi thịt và sinh sản theo phương pháp phân lô so sánh một nhân tố. Mỗi lô dùng 1 loại kháng sinh hay chế phẩm sinh học, lô đối chứng không dùng, các yếu tố khác là như nhau. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

2.4.9.1. Điều trị ngan bệnh bằng kháng sinh

Từ kết quả kháng sinh đồ, lựa chọn một số biệt dược chứa kháng sinh mà các chủng *E. coli* còn mẫn cảm và an toàn để điều trị ngan bệnh. Tiến hành theo dõi sức khỏe, tỷ lệ chết, khỏi bệnh, khả năng tăng khối lượng (cân ở 8 tuần tuổi) và sinh sản của ngan.

2.4.9.2. Phòng bệnh cho ngan bằng axit hữu cơ hoặc chế phẩm sinh học

Thí nghiệm bố trí trên đàn ngan nuôi thịt (50 con/lô) và sinh sản (100 con/lô). Các chế phẩm là Lactobac C (axit hữu cơ, enzym tiêu hoá, chất điện giải và vi khuẩn sản sinh axit lactic), liều 1 g/2 lít nước/ngày. Lee mecon (*Lactate Streptococcus*: 2×10^9 CFU; *Bacillus*: 2×10^9 CFU, Oligosaccharide: 20%), liều 100 g cho 1000 ngan con hoặc 500 ngan lớn trong 1 ngày. Dùng liên tục trong 5 ngày. Mỗi tháng dùng 1-2 liệu trình khi có yếu tố bất lợi cho đàn ngan.

2.4.10. Xử lý số liệu: Theo phương pháp thống kê sinh vật học bằng chương trình Excell và Minitab 14.

PHẦN III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm cơ bản của Colibacillosis trên ngan nuôi tại một số cơ sở ở Hà Nội, Hà Nam

3.1.1. Đánh giá tình hình ngan nghi mắc Colibacillosis

Qua tiến hành theo dõi các đàn ngan, chúng tôi nhận thấy: ngan thường mắc Colibacillosis, Pasteurellosis, Salmonellosis và bệnh viêm ruột hoại tử do *C. perfringens* gây ra, trong đó Colibacillosis là phổ biến nhất. Dựa vào triệu chứng, bệnh tích và kết quả phân lập vi khuẩn gây bệnh ở các đàn ngan, kết quả được thống kê ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Tỷ lệ ngan nghi mắc và chết do Colibacillosis từ năm 2007 - 2009 tại một số cơ sở nuôi ngan

Năm	SL ngan theo dõi	Ngan nghi mắc Colibacillosis		Ngan chết nghi mắc Colibacillosis	
		SL (con)	Tỷ lệ (%)	SL (con)	Tỷ lệ (%)
2007	3.790	378	9,97	121	3,19
2008	5.881	567	9,64	155	2,64
2009	6.578	512	7,78	134	2,04
Tổng hợp	16.249	1.457	8,97	410	2,52

Năm 2007, tỷ lệ ngan nghi mắc Colibacillosis là 9,97% và tỷ lệ chết là 3,19%, năm 2008 là 9,64% và 2,64%, nhưng đến năm 2009, một số cơ sở đã cải thiện điều kiện chăn nuôi và thực hiện giải pháp phòng bệnh, nên tỷ lệ ngan mắc, chết do bệnh giảm, chỉ còn 7,78% và 2,04%.

3.1.2. Kết quả thống kê ngan nghi mắc Colibacillosis theo mùa

Bảng 3.2 cho thấy tỷ lệ ngan mắc và chết nghi do Colibacillosis vào mùa xuân là cao nhất (15,61 và 5,32%), mùa hạ là 14,00 và 4,51%. Mùa thu, tiết trời hanh khô, ngan mắc và chết do bệnh là thấp nhất (5,74 và 1,67%). Sự sai khác giữa tỷ lệ mắc, chết do bệnh vào mùa xuân, hạ so với các mùa thu và đông là có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Bảng 3.2. Tỷ lệ ngan mắc và chết nghi do Colibacillosis theo mùa

Năm	Mùa xuân			Mùa hạ			Mùa thu			Mùa đông		
	Số ngan theo dõi (con)	Số ngan nghi mắc (con) (tỷ lệ %)	Số ngan chết (con) (tỷ lệ %)	Số ngan theo dõi (con)	Số ngan nghi mắc (con) (tỷ lệ %)	Số ngan chết (con) (tỷ lệ %)	Số ngan theo dõi (con)	Số ngan nghi mắc (con) (tỷ lệ %)	Số ngan chết (con) (tỷ lệ %)	Số ngan theo dõi (con)	Số ngan nghi mắc (con) (tỷ lệ %)	Số ngan chết (con) (tỷ lệ %)
2007	580	96 16,55	35 6,03	580	91 15,69	30 5,2	580	34 5,86	8 1,38	580	41 7,07	15 2,59
2008	1650	266 16,12	95 5,76	1650	246 14,91	78 4,73	1650	95 5,76	31 1,88	1650	110 6,67	43 2,61
2009	1850	275 14,86	87 4,7	1850	239 12,92	76 4,11	1850	105 5,68	29 1,57	1850	114 6,16	37 2
Tổng hợp	4080	637 15,61	217 5,32	4080	571 14	184 4,51	4080	243 5,74	68 1,67	4080	265 6,5	95 2,33

3.1.3. Kết quả thống kê ngan nghi mắc bệnh Colibacillosis theo lứa tuổi

Bảng 3.3. Ngan mắc và chết nghi do Colibacillosis theo lứa tuổi

Năm	Tổng số ngan theo dõi cùng lứa tuổi	Ngan nghi mắc Colibacillosis				Ngan chết nghi do Colibacillosis			
		1-8 (tuần) SL (con) Tỷ lệ (%)	>8-16 (tuần) SL (con) Tỷ lệ (%)	>16-24 (tuần) SL (con) Tỷ lệ (%)	>24-bán (tuần) SL (con) Tỷ lệ (%)	1-8 (tuần) SL (con) Tỷ lệ (%)	>8-16 (tuần) SL (con) Tỷ lệ (%)	>16-24 (tuần) SL (con) Tỷ lệ (%)	>24-bán (tuần) SL (con) Tỷ lệ (%)
2007	620	110 17,74	46 7,42	27 4,35	36 5,80	35 5,65	15 2,42	9 1,45	13 2,10
2008	1500	251 16,73	102 6,80	63 4,2	84 5,60	82 5,47	36 2,40	18 1,20	36 2,40
2009	1280	208 16,25	82 6,41	52 4,06	71 5,55	69 5,39	48 3,75	16 1,25	31 2,42
Tổng hợp	3400	569 16,74	230 6,76	167 4,91	191 5,60	186 5,47	99 2,91	43 1,27	80 2,35

Từ 1-8 tuần tuổi là giai đoạn ngan con, các chức năng trong cơ thể chưa hoàn thiện, tốc độ tăng khối lượng cơ thể nhanh, đồng thời ngan thay lông, mọc lông ống mới, riêng đối với ngan nuôi sinh sản, khẩu phần ăn bắt đầu bị hạn chế, do đó tỷ lệ ngan mắc và chết do bệnh là cao nhất (16,74 và 5,47%), cao hơn hẳn các giai đoạn khác ($P < 0,05$). Giai đoạn sinh sản (>24 tuần tuổi), thời điểm tỷ lệ đẻ gần đến đỉnh cao, sức đề kháng của ngan giảm, ngan dễ mắc và chết do bệnh.

3.1.4. Triệu chứng của các ngan nghi mắc Colibacillosis

Bảng 3.4 thống kê kết quả kiểm tra các triệu chứng của ngan nghi mắc Colibacillosis: Kết quả cho thấy triệu chứng ở đường tiêu hoá (tiêu chảy phân xanh, nhày, lẫn máu) chiếm tỷ lệ 65,62%; khó thở chiếm 51,11%; bỏ ăn và ủ rũ chiếm 47,66%; Ngan sinh sản mắc bệnh, tiêu chảy phân xanh có khi lẫn máu, đẻ giảm, trứng non, mỏng vỏ, méo mó. Điều quan trọng là những ngan có triệu chứng khó thở hoặc tiêu chảy ra máu thường chết

nhau với tỷ lệ cao, tỷ lệ chết trung bình của ngan mắc Colibacillosis ở các cơ sở là 27,47%. Đây là thiệt hại đáng được quan tâm.

Bảng 3.4. Các triệu chứng của ngan nghi mắc Colibacillosis

Cơ sở theo dõi	Tổng số ngan nghi mắc Colibacillosis (con)	Các triệu chứng bệnh				Ngan chết do Colibacillosis
		Bỏ ăn, ủ rũ	Phân xanh, nhày, lẫn máu	Khó thở	Các triệu chứng khác	
		SL (con) Tỷ lệ (%)	SL (con) Tỷ lệ (%)	SL (con) Tỷ lệ (%)	SL (con) Tỷ lệ (%)	
1	200	105 52,5	137 68,50	81 40,5	13 6,5	59 29,5
2	500	235 47	351 70,2	215 43	34 6,8	143 28,6
3	950	426 44,84	650 68,42	531 55,89	81 8,53	269 28,32
4	1200	530 44,17	780 65	648 54	107 8,92	328 27,33
5	2100	1063 50,62	1330 63,33	1055 50,24	183 8,71	561 26,71
Tổng hợp	4950	2359 47,66	3248 65,62	2530 51,11	418 8,44	1360 27,47

3.1.5. Bệnh tích ngan nghi mắc Colibacillosis

Kết hợp với chẩn đoán trong phòng thí nghiệm (sẽ được trình bày chi tiết ở các phần sau), mổ khám 293 ngan với những triệu chứng trên, hầu hết các ngan đều có biểu hiện ít nhất là hai loại bệnh tích. Thở viêm túi khí là phổ biến nhất (54,27%), tiếp theo là viêm ruột (49,49%). Ngan sinh sản mắc bệnh, ngoài các bệnh tích chung đã nêu trên, có thể buồng trứng biến dạng, trứng non bị vỡ ra, gây viêm dính xoang phúc mạc, bệnh tích này dễ nhầm lẫn với bệnh thương hàn, do vậy, khi chẩn đoán lâm sàng không chắc chắn thì phải kết hợp với các chẩn đoán trong phòng thí nghiệm (phân lập, xác định căn nguyên gây bệnh). Các triệu chứng và bệnh tích trên ngan trong nghiên cứu này tương tự như các tác giả: Nguyễn Xuân Bình (2006) mô tả Colibacillosis trên gà; các tác giả Gross (1994), Dho-Moulin và Fairbrother (1999), Kikuyasu Nakamura (2000) mô tả Colibacillosis trên gia cầm.

3.2. Kết quả phân lập và giám định vi khuẩn *E. coli* từ các phủ tạng của gan nghi mắc Colibacillosis

3.2.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *E. coli* từ các phủ tạng của gan bệnh

Từ 122 mẫu phủ tạng của các gan ốm và chết nghi mắc Colibacillosis, số mẫu gan phân lập được vi khuẩn *E. coli* chiếm tỷ lệ cao nhất (100%), tiếp đến là lách (97,54%), phổi và túi khí là 83,61% và 82,79%, máu tim là 30,33%.

3.2.2. Kết quả giám định một số đặc tính sinh hóa của các chủng *E. coli* phân lập được

Kết quả giám định đặc tính sinh hóa của 122 chủng *E. coli* (mỗi chủng vi khuẩn đại diện cho 1 gan bệnh): 6/122 chủng (4,9%) có khả năng gây dung huyết; 100% chủng có khả năng di động và sản sinh Indol, nhưng không chủng nào có khả năng sinh H₂S; 100% chủng có khả năng tạo khuẩn lạc màu đỏ trên thạch Congo; phản ứng sinh Indol và MR dương tính. Các phản ứng VP và Citrat đều âm tính. Tỷ lệ các chủng lên men đường lactose và glucose là 100%, mannitol là 95,1%, sorbitol là 93,4%; maltose là 91,0%; xylose là 79,5%, với đường Inositol 100% âm tính. 122 chủng vi khuẩn phân lập được đều có các đặc điểm hoàn toàn phù hợp với cách phân loại và giám định vi khuẩn *E. coli* của Edwards & Ewing (1972) đã công bố.

3.3. Kết quả xác định một số yếu tố gây bệnh của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được

3.3.1. Kết quả xác định các yếu tố bám dính

3.3.1.1. Kết quả xác định yếu tố bám dính F1 (*F1 fimbriae*)

* *Kết quả xác định F1 fimbriae bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu*

Số chủng vi khuẩn *E. coli* có khả năng gây ngưng kết hồng cầu bò, cừu và gà theo thứ tự là 44, 38, 43 chủng trong phản ứng có mặt của 2,5% đường D-Mannose với hiệu giá pha loãng vi khuẩn là $\geq 1/4$. Đây chính là

những chủng kháng lại đường D-Mannose. Số chủng còn lại vẫn cảm với đường D-Mannose, là chủng mang F1 fimbriae.

* *Kết quả xác định F1 fimbriae bằng phản ứng PCR*

Trong 122 chủng được kiểm tra, có 109/122 chủng (89,34%) mang gen FimA và 30/122 chủng (24,59%) mang gen FimH.

Bảng 3.9. Kết quả xác định gen quy định khả năng sản sinh F1 fimbriae bằng phản ứng PCR

Yếu tố độc lực	Gen xác định	Mã hóa protein	Kết quả	
			Số chủng (+)/Số chủng kiểm tra	Tỷ lệ %
F1 fimbriae	FimA	Protein chính của F1 Fimbriae	109/122	89,34
	FimH	Tiểu phần bám dính của F1 Fimbriae	30/122	24,59

Tổng hợp các kết quả xác định F1 fimbriae về kiểu hình (bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu) và kiểu gen (phương pháp PCR), kết quả cho thấy: chỉ có 78-84 chủng (63,9-68,9%) có bọc lợ F1 fimbriae trong điều kiện *in vitro*, nhưng có tới 109 chủng (89,34%) mang gen FimA, chỉ có 30/122 chủng (24,59%) mang cả 2 gen FimA và FimH.

3.3.1.2. *Kết quả xác định yếu tố bám dính P fimbriae và yếu tố xâm nhập (Intimin)*

Bảng 3.10. Kết quả xác định gen quy định khả năng sản sinh P fimbriae và Intimin của vi khuẩn *E. coli*

Yếu tố độc lực	Gen xác định	Mã hóa protein	Kết quả	
			Số chủng (+)/Số chủng kiểm tra	Tỷ lệ %
P Fimbriae	PapC	P Fimbriae	65/122	53,28
Intimin	eae	Protein Intimin (bám dính và xâm nhập)	6/122	4,92

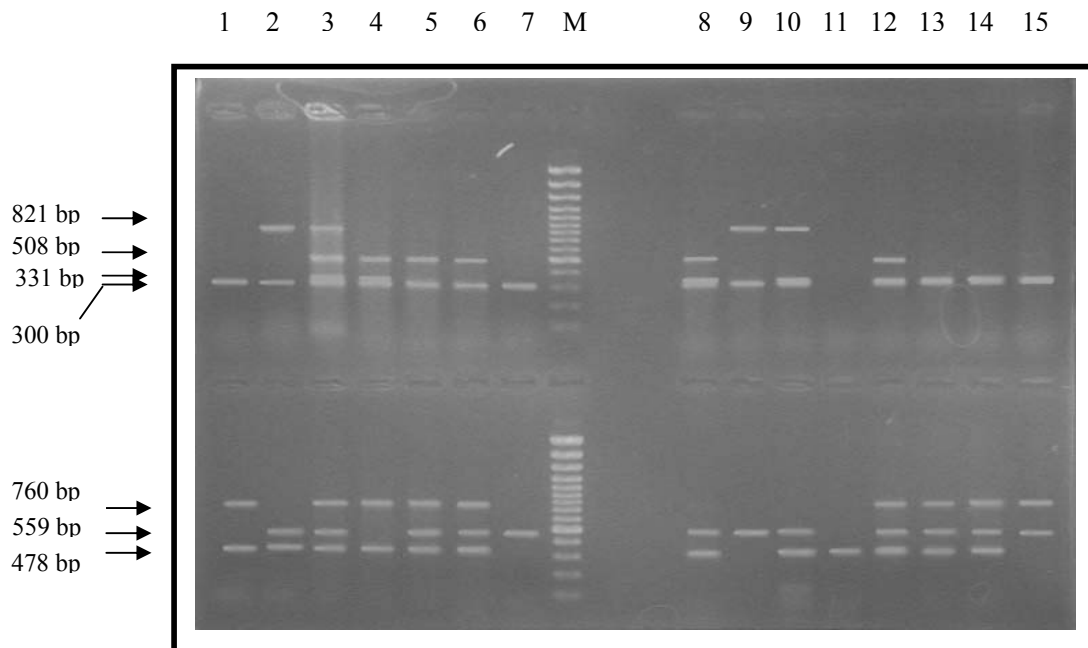
Kết quả có 65/122 chủng mang gen PapC (53,28%) và 6/122 chủng mang gen eae (4,92%). Kết quả về tỷ lệ của các chủng mang gen PapC và eae trong

nghiên cứu này là cao hơn nhiều so với một số nghiên cứu của Janßen và cs (2001), Delicato và cs (2003), ... đã công bố.

3.3.2. Kết quả xác định một số gen liên quan đến khả năng thu nhận sắt

Bảng 3.11. Kết quả xác định gen quy định khả năng thu nhận sắt của các chủng *E.coli* phân lập được

Yếu tố độc lực	Gen xác định	Mã hóa protein	Kết quả	
			Số chủng (+)/Số chủng kiểm tra	Tỷ lệ %
Hệ thống nhu nhận sắt	<i>IutA</i>	Yếu tố cảm thụ aerobactin	112/122	91,80
	<i>IucA</i>	Tổng hợp aerobactin	98/122	80,32



Hình 3.17: Các sản phẩm của phản ứng PCR sau quá trình điện di để xác định một số yếu tố độc lực của vi khuẩn *E. coli*

Ghi chú: Hàng trên: Giếng 1: *IutA* dương tính (Đối chứng dương). Giếng 2: *IutA* và *IucA* dương tính (Đối chứng dương). Giếng 3: *IutA*, *FimA*, *FimH* và *IucA* dương tính (Chủng phân lập - CPL). Giếng 4, 9: *IutA*, *FimA*, *FimH* dương tính (CPL). Giếng 5, 6, 13: *IutA* và *FimH* dương tính (CPL). Giếng 7: *IutA* dương tính (CPL). Giếng 8: *IutA*, *FimA* dương tính (CPL). Giếng 10: *IutA* và *IucA* dương tính (CPL). Giếng 11: *IutA*, *FimA* và *IucA* dương tính (CPL). Giếng 12: Âm tính. Giếng 14, 15, 16: *IutA* dương tính (CPL). M: 100 bp marker.

Hàng dưới: Giếng 1: *CvaC* và *Iss* dương tính (Đối chứng dương). Giếng 2, 9, 11: *CvaC* và *Tsh* dương tính (CPL). Giếng 3, 5, 6, 13, 14, 15: *CvaC*, *Tsh* và *Iss* dương tính (CPL). Giếng 4: *CvaC* và *Iss* dương tính (CPL). Giếng 7, 8, 10: *Tsh* dương tính (CPL). Giếng 12: *CvaC* dương tính (CPL). Giếng 16: *Tsh* và *Iss* dương tính (CPL). M: 100 bp marker.

Bảng 3.11 cho thấy có 112/122 chủng (91,80%) mang gen *iutA* và

98/122 chủng (80,32%) mang gen *iucA*. Kết quả này là tương đương với nghiên cứu của Võ Thành Thìn và cs (2008a) khi nghiên cứu các chủng *E. coli* trên gà và đã phát hiện thấy có 90% số chủng mang gen *iutA*; và kết quả nghiên cứu của Dozois và cs (1992), Delicato và cs (2003).

3.3.3. Kết quả xác định khả năng kháng bổ thể trong huyết thanh

* Kết quả xác định bằng phương pháp ức chế bổ thể

Tất cả các chủng vi khuẩn được kiểm tra đều có khả năng đề kháng với bổ thể trong huyết thanh gà, trong đó có 103 chủng (84,43%) đề kháng mạnh và 19 chủng (15,57%) đề kháng trung bình. Kết quả này tương đương với một số nghiên cứu của Võ Thành Thìn và cs (2008b), Vandekerchove và cs (2005), Brenda và cs (1993).

* Kết quả xác định bằng phương pháp PCR

Trong số 122 chủng *E. coli* được kiểm tra, có 84 chủng mang gen *Iss* (chiếm 68,85%), 73 chủng mang gen *Tsh* (chiếm 59,84%) và 87 chủng mang gen *CvaC* (chiếm 71,31%).

Bảng 3.13. Kết quả xác định một số gen liên quan đến khả năng kháng bổ thể trong huyết thanh của các chủng *E. coli*

Yếu tố độc lực	Gen xác định	Mã hóa protein	Kết quả	
			Số chủng dương tính/Số chủng kiểm tra	Tỷ lệ %
Khả năng kháng bổ thể trong huyết thanh	<i>Iss</i>	Tăng khả năng sống trong huyết thanh	84/122	68,85
	<i>Tsh</i>	Ngưng kết hồng cầu tổ mẫn cảm nhiệt độ	73/122	59,84
	<i>CvaC</i>	Colicin V	87/122	71,31

3.3.4. Kết quả xác định một số loại độc tố

Trong số 122 chủng *E. coli* được kiểm tra, không chủng nào có gen *Cnf1* và *Stx2*, tuy nhiên, có tới 30/122 chủng (24,59%) có mang gen *Cnf2* và 6/122 chủng mang gen *Stx1* (4,92%).

Bảng 3.14. Kết quả xác định một số gen liên quan đến độc tố của các chủng *E. coli* phân lập được bằng phương pháp PCR

Yếu tố độc lực	Gen xác định	Mã hóa protein	Kết quả	
			Số chủng dương tính/Số chủng kiểm tra	Tỷ lệ %
Độc tố	<i>Cnf1</i>	Yếu tố gây độc và hoại tử tế bào loại 1	0/122	0
	<i>Cnf2</i>	Yếu tố gây độc và hoại tử tế bào loại 2	30/122	24,59
	<i>Stx1</i>	Độc tố Shiga 1	6/122	4,92
	<i>Stx2</i>	Độc tố Shiga 2	0/122	0

3.3.5. Tổng hợp các yếu tố độc lực có trong các chủng *E. coli* phân lập từ ngan bệnh và ngan khỏe

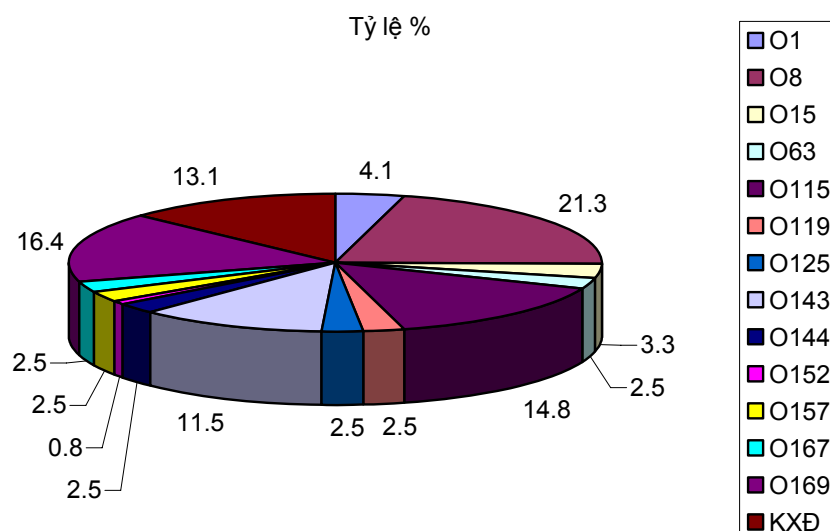
Khảo sát sự có mặt của 13 loại gen (FimA, FimH, PapC, eae, IutA, IucA, Iss, Tsh, CvaC, Cnf1, Cnf2, Stx1, Stx2) trong 122 chủng *E. coli* phân lập từ ngan bị bệnh và 12 chủng từ ngan khỏe như sau:

Có 11/13 loại gen được phát hiện trong số 122 chủng *E. coli* từ ngan bệnh và hai loại gen không phát hiện thấy là Cnf2 và Stx2; trong khi đó, chỉ 6/13 loại gen được phát hiện thấy trong các chủng *E. coli* phân lập từ ngan khỏe là FimA, IutA, IucA, Iss, Tsh và CvaC.

Như vậy, 8 loại gen có sự khác biệt rõ rệt giữa các chủng *E. coli* từ ngan bệnh và ngan khỏe, đó là 5 gen chỉ phát hiện thấy ở các chủng từ ngan bệnh (FimH, PapC, eae, Cnf2 và Stx1) và 3 gen (Iss, Tsh và CvaC) với tỷ lệ cao hơn hẳn từ các ngan bệnh ($P < 0,05$). Kết quả này là tương đương với kết quả nghiên cứu của Rodriguez-Siek và cs (2005), McPeake và cs (2005), Vandekhechove và cs (2005).

3.3.6. Kết quả xác định serotyp của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được

3.3.6.1. Đối với các chủng *E. coli* từ ngan bệnh

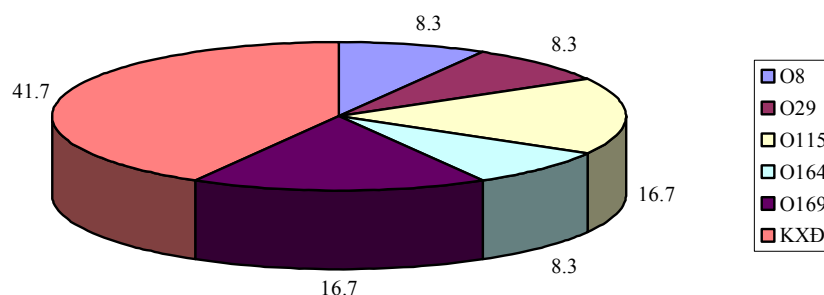


Biểu đồ 3.3a. Kết quả xác định serotyp kháng nguyên O của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được từ nگان bệnh

Kết quả đã xác định được serotyp của 106/122 chủng thuộc về 13 loại kháng nguyên O, trong đó số chủng thuộc O8 chiếm tỷ lệ cao nhất (21,3%), tiếp đến là O169 (16,4%), thấp nhất là O152 (0,8%).

3.3.6.2. Đối với các chủng *E. coli* từ nگان khỏe

Trong số 12 chủng phân lập từ nگان khỏe chỉ 7 chủng xác định được serotyp và thuộc về 5 serotyp kháng nguyên O và có đến 41,7% là không xác định được serotyp.



Biểu đồ 3.3b. Kết quả xác định serotyp kháng nguyên O của các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được từ nگان khỏe

3.3.7. Mối liên quan giữa serotyp O và tổ hợp của các yếu tố gây bệnh

Kết quả đã xác định được 29 loại tổ hợp gen trong số 122 chủng *E.*

coli phân lập từ gan bệnh. Mỗi chủng có thể mang từ 2 đến 9 loại gen, trong đó 3 loại tổ hợp gen là FimA/PapC/IutA/IucA/Cva C/Tsh/Iss; FimA/ PapC /IutA /IucA /Tsh; và FimA/IutA/IucA/CvaC/Iss chiếm tỷ lệ cao nhất (8/122 - 6,6%). Tổ hợp FimH/IucA chiếm tỷ lệ thấp nhất (1 chủng, chiếm 0,8%). Ngoài ra, khi xem xét tới mối tương quan của chúng với các serotyp kháng nguyên O thì thấy có tới 43 loại tổ hợp khác nhau, trong đó phổ biến nhất là các chủng thuộc serotyp O8 và mang gen FimA/PapC/IutA/IucA/Tsh và FimA/IutA/IucA (4,1%). Điều đáng chú ý là ở trong số 12 chủng phân lập được từ gan khỏe, chỉ có 3 chủng thuộc 2 loại tổ hợp gen (4-5 gen), trong đó 2/3 chủng thuộc serotyp O115 và 1 chủng không xác định được serotyp.

3.3.8. Kết quả gây bệnh thực nghiệm trên phôi trứng

3.3.8.1. Đặc tính của các chủng vi khuẩn *E. coli* dùng gây bệnh thực nghiệm trên phôi trứng

Trong số 12 chủng vi khuẩn dùng gây bệnh thực nghiệm: 10 chủng: E-N12, E-N17, E-N21, E-N27, E-N35, E-N36, E-N47, E-N62, E-N63, E-NK2 mang từ 6 đến 9 yếu tố gây bệnh, được phân lập từ gan bệnh và thuộc serotyp gây bệnh (O1, O8, O15, O115 và O143). Chủng E-G163 mang 8 yếu tố gây bệnh (chưa xác định được serotyp), được phân lập từ gà mắc bệnh. Chủng E-R được phân lập từ gan khỏe.

3.3.8.2. Kết quả gây nhiễm thực nghiệm các chủng vi khuẩn *E. coli* trên phôi trứng

Sau khi gây nhiễm, 100% các phôi gan, vịt và gà đều bị chết. Đối với phôi gan và vịt: chết sau thời gian rất ngắn (1-5 ngày), với phôi gà: các chủng phân lập được từ gan gây chết phôi chậm hơn, rải rác sau 1 đến 9 ngày. Chủng E-G163 gây chết phôi nhanh, tại ngày thứ 1 (60%), và ngày thứ 7 và 8 (20%) sau gây nhiễm. Có 3 chủng E-N35, E-N47 và E-N62 gây chết phôi 100% ngay sau khi tiêm 1-2 ngày. Ngược lại, chủng (E-R) đều không gây chết bất kỳ một phôi nào được tiêm, các phôi gan, vịt và gà vẫn nở thành con. Các phôi chết được mổ khám để kiểm tra, đều thấy toàn

bộ bề mặt da ngoài và các cơ quan phủ tạng bị xuất huyết thành từng đám rất nặng. Thời gian phôi chết càng chậm thì xuất huyết càng giảm dần.

Kết quả phân tích thống kê cho thấy: số lượng các phôi bị chết không có sự khác biệt giữa các chủng có nguồn gốc từ ngan hay từ gà ($P>0,05$), nhưng có sự khác biệt rõ giữa các chủng từ ngan, gà bệnh với chủng từ ngan khỏe ($P<0,05$). Từ các kết quả nghiên cứu ở trên, một lần nữa khẳng định vi khuẩn *E. coli* phân lập từ ngan bệnh là căn nguyên gây Colibacillosis trên ngan.

3.3.9. Kết quả xác định khả năng miễn cảm và kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn phân lập được

Các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được có tỷ lệ miễn cảm với 14 loại kháng sinh là khá thấp, 100% kháng với Ampicillin, Cefotiofur và Tetracycline. Ngoại trừ Ceftriaxon, tỷ lệ miễn cảm là 100%.

Hầu hết các loại kháng sinh thuộc nhóm β -Lactam (Amoxicillin) và Aminozit (Amikacin, Apramycin, Gentamicin, Neomycin) hiện đang được sử dụng khá phổ biến trong thú y thì đều đã có từ 55,74 - 96,72% số chủng kháng. Đặc biệt là Enrofloxacin và Norfloxacin thuộc nhóm Quinolon mới được đưa vào sử dụng điều trị bệnh cho động vật đã có tới 79,51% và 87,71% số chủng kháng lại. Những số liệu này là sự báo động về tình trạng sử dụng kháng sinh không có sự kiểm soát trong chăn nuôi gia cầm, đồng thời cũng tương đương với kết quả của các nghiên cứu trong nước mới được công bố gần đây.

3.4. Thử nghiệm phòng và điều trị Colibacillosis cho ngan

3.4.1. Thử nghiệm điều trị Colibacillosis cho ngan

Kết quả trung bình của 3 lần thử nghiệm (Bảng 3.21a) cho thấy lô dùng Gentadox có tỷ lệ khỏi bệnh cao nhất (83%) và tăng khối lượng tốt nhất, tiếp theo là các lô dùng Gentacostrim (76%) và Octamix (74%). Tuy nhiên, sau quá trình điều trị ở cả lô điều trị và lô không điều trị đều có những con còi cọc, yếu chân, và đều ảnh hưởng đến khả năng tăng khối lượng. Khi phân tích thống kê, kết quả sai số trung bình ở lô đối chứng là cao nhất (0,056).

Trong thực tế, các đàn ngan nuôi thịt mắc Colibacillosis nuôi trong điều kiện vệ sinh kém, khi điều trị bệnh không cải thiện được môi trường, không tăng cường chăm sóc nuôi dưỡng và bổ sung điện giải, vitamin, glucoza, thì tỷ lệ chết có thể trên 70 %.

Bảng 3.21a. Kết quả điều trị thử nghiệm ngan nuôi thịt mắc Colibacillosis

Đợt TN	Lô TN	Tên thuốc dùng	Số lượng ngan	Số ngan khỏi bệnh (Tỷ lệ %)	Số ngan chết, loại do bệnh (tỷ lệ %)	Khối lượng trung bình khi bán ($X \pm mx$) (kg/con)
1	1	Gentadox	30	25 (83,33)	5 (16,67)	2,655 ± 0,051
	2	Gentacostrim	30	23 (76,67)	7 (23,33)	2,580 ± 0,063
	3	Octamix	30	23 (76,67)	7 (23,33)	2,585 ± 0,045
	4	Không dùng	30	12 (40,00)	18 (60,00)	2,370 ± 0,077
2	1	Gentadox	20	16 (80,00)	4 (20,00)	2,580 ± 0,087
	2	Gentacostrim	20	13 (65,00)	7 (35,00)	2,575 ± 0,082
	3	Octamix	20	12 (60,00)	8 (40,00)	2,580 ± 0,095
	4	Không dùng	20	8 (40,00)	12 (60,00)	2,455 ± 0,165
3	1	Gentadox	50	42 (84,00)	8 (16,00)	2,615 ± 0,038
	2	Gentacostrim	50	40 (80,00)	10 (20,00)	2,565 ± 0,052
	3	Octamix	50	39 (78,00)	11 (22,00)	2,570 ± 0,053
	4	Không dùng	50	23 (46,00)	27 (54,00)	2,475 ± 0,072
Tổng hợp	1	<i>Gentadox</i>	100	83 (83,00)	17 (17,00)	2,620 ± 0,029
	2	<i>Gentacostrim</i>	100	76 (76,00)	24 (24,00)	2,570 ± 0,035
	3	<i>Octamix</i>	100	74 (74,00)	26 (26,00)	2,580 ± 0,037
	4	<i>Không dùng</i>	100	43 (43,00)	57 (57,00)	2,442 ± 0,056

(Khối lượng ngan khi bán, tính ở 8 tuần tuổi)

Tương tự với ngan nuôi sinh sản, sau 3 đợt điều trị bệnh, lô dùng Gentadox có tỷ lệ khỏi bệnh cao nhất (87,78%), tiếp theo là các lô dùng Gentacostrim (82,22%), Octamix (81,11%) và có sự khác biệt rõ với lô đối chứng (58,89%) ($P < 0,05$).

3.4.2. Thử nghiệm phòng bệnh cho ngan bằng chế phẩm sinh học

Bên cạnh công tác vệ sinh phòng bệnh, việc phòng bệnh chủ động bằng các axit hữu cơ hoặc chế phẩm sinh học cũng là rất cần thiết nhằm tăng sức đề kháng không đặc hiệu cho ngan, giảm khả năng mắc cảm với mầm bệnh, ngoài ra còn có tác dụng làm tăng hiệu quả sử dụng thức ăn, giảm ảnh hưởng của các tác động stress. Bảng 3.22a cho thấy: Lô đối chứng có tỷ lệ nuôi sống và khả năng tăng khối lượng thấp hơn hẳn so với các lô thí nghiệm (84% và 2,584 kg/con), ngược lại ở lô thí nghiệm dùng Lee mencon là cao nhất (98,67% và 2,802 kg/con) ($P < 0,05$).

Bảng 3.22a. Kết quả phòng bệnh cho ngan nuôi thịt bằng axit hữu cơ hoặc chế phẩm sinh học

Đợt TN	Lô TN	Tên chế phẩm	Số lượng ngan (con)	Tỷ lệ chết do bệnh (%)	Tỷ lệ nuôi sống (%)	Khối lượng trung bình khi xuất bán ($X \pm mx$) (kg/con)
1	1	Lactobac C	50	0	94	2,775 \pm 0,028
	2	Lee mencon	50	0	100	2,853 \pm 0,017
	3	Không dùng	50	0	94	2,697 \pm 0,040
2	1	Lactobac C	50	0	94	2,707 \pm 0,030
	2	Lee mencon	50	0	98	2,753 \pm 0,028
	3	Không dùng	50	16	82	2,541 \pm 0,045
3	1	Lactobac C	50	0	96	2,715 \pm 0,029
	2	Lee mencon	50	0	98	2,810 \pm 0,031
	3	Không dùng	50	20	76	2,515 \pm 0,050
Tổng hợp	1	Lactobac C	150	0	94,67	2,732 \pm 0,017
	2	Lee mencon	150	0	98,67	2,802 \pm 0,015
	3	Không dùng	150	12	84	2,584 \pm 0,028

Kết quả theo dõi trên các đàn ngan nuôi sinh sản được từ lúc mới nở cho đến hết 7 tháng đẻ (28 tuần đẻ) cho thấy: nhìn chung, tỷ lệ ngan ở lô 2 (dùng Lee mencon) cho tỷ lệ đẻ là cao nhất 61,86%, đồng thời chất lượng trứng

giống tốt nên tỷ lệ nở cũng cao nhất (82,99%). Tỷ lệ đẻ và tỷ lệ nở thấp nhất ở lô đối chứng (57,65 và 79,46%).

Các axit hữu cơ tác động lên vi khuẩn *E. coli* theo một số cơ chế sau đây: ức chế sự phát triển của vi khuẩn có hại, duy trì cân bằng vi khuẩn đường ruột (eubiosis/dysbiosis), diệt vi khuẩn gây bệnh, hỗ trợ tiêu hoá và hấp thu các chất dinh dưỡng; hoạt hóa pepsinogen, hỗ trợ tiêu hóa protein, tăng độ hòa tan và hỗ trợ hấp thu chất khoáng, đặc biệt vi khoáng, kích thích ruột tiết secretin, giúp tụy tiết nhiều bicarbonate và axit mật, giúp lipid trong thức ăn tiêu hóa, hấp thu tốt hơn, tăng tái tạo lớp tế bào vi lông nhung (Vũ Duy Giảng, 2007).

Trong khi đó, các chế phẩm sinh học (probiotic) thì lại có cơ chế tác dụng như sau: vi khuẩn probiotic sản sinh một số chất như bacteriocins, nicin, lysozyme, lactoperoxidase, axit lactic, axit béo chuỗi ngắn... có tác dụng tiêu diệt hay ức chế vi khuẩn có hại, duy trì eubiosis (Trần Quốc Việt, 2008). Các vi khuẩn probiotics có khả năng tổng hợp vitamin (axit folic, niacin, riboflavin, vitamin B6 & B12), làm cải thiện tỷ lệ tiêu hóa chất dinh dưỡng như protein và lipid, nâng cao đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu; giảm nhẹ triệu chứng dị ứng; giảm tiêu chảy do sử dụng kháng sinh trong thời gian dài (Patterson, 2003).

PHẦN IV: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận: Từ các kết quả nghiên cứu thu được, rút ra một số kết luận sau:

4.1.1. Colibacillosis là một bệnh nguy hại cho ngan. Tỷ lệ ngan mắc và chết do bệnh cao nhất vào mùa xuân (15,61 và 5,32%), mùa hạ (14,00 và 4,51%), thấp nhất vào mùa thu. Ngan ở 1-8 tuần tuổi, mắc cảm nhất với bệnh, tỷ lệ ngan mắc và chết do bệnh là 16,74 và 5,47%.

4.1.2. Các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được từ ngan bệnh đều mang đầy đủ các đặc tính sinh học của loài.

4.1.3. Tất cả các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được từ gan bệnh đều có khả năng kháng bổ thể trong huyết thanh tươi của gà, 84,43% số chủng đề kháng mạnh, còn lại là đề kháng trung bình.

4.1.4. Bằng phương pháp PCR, đã phát hiện được 11 gen quan trọng trên các chủng *E. coli* phân lập từ gan bệnh: FimA, FimH, PapC, eae, Iut A, Iuc A; Iss; Tsh; CvaC; Cnf2 và Stx1 với tần suất từ 4,92 đến 91,8%; không phát hiện thấy 2 loại gen Cnf1 và Stx2. Chỉ phát hiện được 6 gen ở các chủng *E. coli* phân lập từ gan khỏe, tỷ lệ các gen Iss, Tsh và CvaC của *E. coli* phân lập từ gan bệnh cao hơn gan khỏe ($P < 0,05$).

4.1.5. 106/122 chủng *E. coli* phân lập được từ gan bệnh thuộc về 13 loại kháng nguyên O: O8 chiếm tỷ lệ cao nhất (21,3%), trong khi đó 7/12 chủng *E. coli* từ gan khỏe thuộc 5 loại kháng nguyên O: O8 (8,3%).

4.1.6. Trong số 122 chủng *E. coli* từ gan bệnh, đã xác định được 29 loại tổ hợp gen, một chủng có thể mang từ 2 đến 9 loại gen. Với 12 chủng từ gan khỏe, chỉ có 3 chủng mang 2 loại tổ hợp gen.

4.1.7. Tất cả 11 chủng *E. coli* từ gan, gà bệnh đều gây chết phôi gan, vịt từ 1-5 ngày, phôi gà trong thời gian từ 1-10 ngày, với các bệnh tích điển hình, trong khi đó, lô tiêm chủng *E. coli* từ gan khỏe (không độc) với liều tiêm và đường tiêm tương đương đều không gây chết bất kỳ một phôi nào.

4.1.8. Vi khuẩn *E. coli* phân lập được có sự miễn cảm khác nhau với 14 loại kháng sinh. Dùng Gentadox, Gentacostrim hoặc Octamix với liều 1 g/10 kg gan/5 ngày, điều trị Colibacillosis, kết hợp với các thuốc trợ sức trợ lực và tăng cường vệ sinh thú y.

4.1.9. Dùng Lactobac C (1g/2 lít nước) hoặc Lee mencon (100g/ 1000 gan con hoặc 500 gan trưởng thành), dùng trong 5 ngày, mỗi tháng 1 – 2 liệu trình đã hạn chế đáng kể Colibacillosis cho gan.

4.2. Đề nghị

Áp dụng kết quả nghiên cứu để phòng và trị bệnh cho gan.