



KHOA HỌC KỸ THUẬT Thú y

JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE AND TECHNOLOGY

ISSN 1859 - 4751

Tập XXVII • Số 7 - 2020

HỘI THÚ Y VIỆT NAM
VIETNAM VETERINARY ASSOCIATION

MỤC LỤC

NGHIÊN CỨU KHOA HỌC

- NGUYỄN ĐỨC HIỀN, LÊ TRUNG HOÀNG, NGUYỄN QUỐC VINH, ĐOÀN VĂN LIỆT, NGUYỄN NGỌC PHÚ VINH, HUỖNH MINH TRÍ
Bước đầu nghiên cứu bệnh dịch tả heo châu Phi tại thành phố Cần Thơ 5
- ĐẶNG THANH LONG, NGUYỄN THÁI HOÀNG, HUỖNH VĂN CHƯƠNG, HOÀNG THỊ KIM HỒNG, LÊ LÝ THÙY TRÂM, CHẾ THỊ KIM NGÂN, NGUYỄN THANH PHÚ
Nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện gen *thermostable direct hemolysin (tdh)* của vi khuẩn *Vibrio* sp. phân lập từ cá hồng Mỹ nuôi ở vùng ven biển Thừa Thiên-Huế trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) 16
- NGUYỄN XUÂN HÒA, PHẠM ĐĂNG TUẤN, LÊ TRẦN HOÀN, LÊ QUỐC VIỆT, THƯỢNG THỊ THANH LÊ, PHAN VŨ HẢI, TRẦN QUANG VUI
Độc lực và tính miễn cảm kháng sinh của vi khuẩn *Escherichia coli* phân lập từ bê sữa bị bệnh tiêu chảy 24
- TRẦN TRUNG MỸ, LÊ VĂN THIÊN, PHẠM TUẤN HIỆP, ĐẶNG XUÂN BÌNH
Kết quả phân lập một số vi khuẩn gây bệnh viêm vú bò tại các trang trại bò sữa TH 31
- NGUYỄN ĐỨC TÂN, NGUYỄN THỊ THẨM, ĐÀO DUY HÙNG, TRẦN VĂN TRUNG, PHẠM KHÁNH NAM
Đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch của lợn đối với vacxin tứ giá phòng bệnh tụ huyết trùng, phó thương hàn, đóng dấu, dịch tả lợn 38
- NGUYỄN THỊ THANH HÀ, NGUYỄN VĂN THANH, NGUYỄN THANH HẢI
Đánh giá khả năng ức chế *in vitro* trên vi khuẩn gây bệnh viêm tử cung bò của thảo dược bò công anh khi sử dụng phối hợp với nano bạc 46
- LA VĂN CÔNG, ĐẶNG THỊ MAI LAN, NGUYỄN THÙY DƯƠNG
Tình hình nhiễm giun đầu gai *Macracanthorhynchus hirudinaceus* ở lợn tại tỉnh Bắc Kạn 53
- NGUYỄN VĂN TUYÊN, NGUYỄN THỊ KIM LAN, NGUYỄN THỊ NGÂN
Nghiên cứu đặc điểm bệnh lý, lâm sàng của bệnh giun phổi trên lợn bản địa tại tỉnh Điện Biên 59
- NGUYỄN HỮU HÙNG, NGUYỄN HỒ BẢO TRÂN
Tình hình nhiễm cầu trùng ở gà lông màu nuôi theo phương thức bán công nghiệp tại tỉnh Hậu Giang 67
- TRẦN TRỌNG KHA, PHAN THỊ NGỌC ANH, TRẦN THỊ QUỲNH LAN
Thử nghiệm chiết xuất Immunoglobulin Y (IgY) từ lòng đỏ trứng gà 75

NÂNG CAO - THAM KHẢO

- TRẦN MINH HẰNG, MẠC THỊ CÔNG LÝ, NGUYỄN VIỆT HÙNG, BRITT PINKOWSKI TERSBOL, ĐẶNG THỊ THANH SƠN, ANDERS DALSGAARD
Một số yếu tố xã hội ảnh hưởng đến việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi lợn tại tỉnh Bắc Ninh 83
- SHU YUAN, SI-CONG JIANG, ZI-LIN LI
Phân tích các vật chủ trung gian có thể của Coronavirus mới SARS-CoV-2 89

TRAO ĐỔI KHKT - HOẠT ĐỘNG NGÀNH

- NGUYỄN NGỌC SƠN
Quận Tây Hồ, Hà Nội được công nhận vùng an toàn bệnh động vật đối với bệnh dại 95
- NGUYỄN VĂN HÙNG
Hội Chăn nuôi và Thú y Thừa Thiên-Huế với vai trò tái đàn an toàn sinh học và phòng chống dịch bệnh gia súc, gia cầm có hiệu quả 97

ĐỘC LỰC VÀ TÍNH Mẫn CẢM KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* PHÂN LẬP TỪ BÊ SỮA BỊ BỆNH TIÊU CHẢY

Nguyễn Xuân Hòa¹, Phạm Đăng Tuấn², Lê Trần Hoàn¹,
Lê Quốc Việt¹, Thương Thị Thanh Lê¹, Phan Vũ Hải¹, Trần Quang Vui¹

TÓM TẮT

Bệnh tiêu chảy ở bê giai đoạn bú sữa do vi khuẩn *E. coli* là nguyên nhân chính gây tổn thất kinh tế cho người chăn nuôi. 74 mẫu phân bê sữa bị bệnh tiêu chảy đã được thu thập tại huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng để xác định vai trò gây bệnh và tính mẫn cảm kháng sinh của vi khuẩn *E. coli*. Kết quả đã phân lập được 73 chủng vi khuẩn *E. coli* gây bệnh tiêu chảy ở bê sữa. Sử dụng kỹ thuật PCR để kiểm tra gen độc từ những chủng *E. coli* phân lập đã phát hiện được 15 chủng có mang gen mã hóa độc tố; trong đó 13/15 chủng mang gen mã hóa độc tố bám dính (*eae*) (17,80%), 3/15 chủng mang gen mã hóa độc tố Shiga (*Stx2*) (4,10%) và 1/15 chủng mang cả 2 gen mã hóa độc tố trên (1,37%). 10/15 chủng vi khuẩn có độc lực cao, giết chết 100% chuột thí nghiệm trong khoảng thời gian 6 đến 20 giờ. Các chủng *E. coli* độc lực cao rất mẫn cảm với enrofloxacin (90%), gentamicin (80%) và ceftiofur (80%); trong khi đó đề kháng với amoxicillin, doxycyclin, oxytetracyclin với tỷ lệ lần lượt là 50, 70 và 90%. Kết quả nghiên cứu cho thấy vi khuẩn *E. coli* mang gen độc là tác nhân gây nên bệnh tiêu chảy ở bê sữa, vì vậy cần định kỳ kiểm tra tính mẫn cảm kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* để nâng cao hiệu quả điều trị và hạn chế kháng kháng sinh của vi khuẩn.

Từ khóa: Mẫn cảm kháng sinh, bê sữa, tiêu chảy, *E. coli*.

Study on virulence and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* isolated from diarrheic dairy calves

Nguyen Xuan Hoa, Pham Dang Tuan, Le Tran Hoan,
Le Quoc Viet, Thuong Thi Thanh Le, Phan Vu Hai, Tran Quang Vui

SUMMARY

Diarrhea in the calves during the suckling period caused by *E. coli* results in high economic losses for farmers. Seventy-four fecal samples of the diarrheic dairy calves were collected from Duc Trong district, Lam Dong province for determining the pathogenicity and antibiotic susceptibility of *E. coli*. The studied results showed that the biochemical characteristics of 73 isolated strains of *E. coli* were fully similar to the descriptions in the reference publications. By using PCR technique to check for toxic genes of the isolated *E. coli* strains, there were 15 strains carried toxic genes, of which 13/15 *E. coli* strains carried *eae* gene (17.80%); 3/15 strains carried *Stx2* gene (4.10%); 1/15 *E. coli* strains carried both *eae* and *Stx2* genes (1.37%). 10/15 strains carried high virulence, killed 100% of the experimental mice within 6 to 20 hours. Highly virulent *E. coli* strains were extremely susceptible to enrofloxacin (90%), gentamicin (80%) and ceftiofur (80%), but resistant to amoxicillin, doxycyclin and oxytetracyclin with the ratio of 50, 70 and 90%, respectively. The studied results also revealed that, *E. coli* strains carrying toxic genes were the causative agents of diarrhea in the dairy calves, therefore it is necessary to periodically test the antibiotic susceptibility of the *E. coli* to improve the treatment effectiveness and limit antibiotic resistance.

Keywords: Antibiotic susceptibility, dairy calves, diarrhea, *E. coli*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tiêu chảy ở bê giai đoạn bú sữa do vi

khẩn *E. coli* gây ra rất phổ biến ở các trại chăn nuôi. Vi khuẩn *E. coli* thường ký sinh trong ruột già của động vật và nó duy trì một số lượng nhất

¹ Trường Đại học Nông Lâm Huế

² Trại Chăn nuôi và Thú y huyện Vĩnh Linh, tỉnh Quảng Trị

định cân bằng với các hệ vi sinh vật có lợi trong đường ruột. Vì vậy, khi sức đề kháng của cơ thể giảm do các tác nhân thời tiết khí hậu, biến động do tách nhập đàn, thức ăn, nước uống; số lượng của *E. coli* tăng nhanh, sản sinh độc tố, gây rối loạn trao đổi nước và các chất điện giải, gây ra tiêu chảy (Lê Minh Chí, 1995). Nghiên cứu về độc lực của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ bê tiêu chảy cho thấy hai loại độc tố chịu nhiệt và không chịu nhiệt là thành phần chính của enterotoxin (Smith, 1963). Từ lâu việc dùng thuốc kháng sinh được xem như biện pháp hữu hiệu trong điều trị bệnh, tuy nhiên lạm dụng kháng sinh trong phòng, trị dẫn đến kháng thuốc tràn lan làm cho hiệu quả điều trị giảm, cá biệt có nhiều trường hợp điều trị không khỏi dẫn đến tử vong ở bê (Phạm Ngọc Thạch, 1998; Nguyễn Bá Hiên, 2001). Nghiên cứu của Bùi Thị Ba và cs. (2012) cho thấy chủng vi khuẩn *E. coli* gây bệnh tiêu chảy trên bò thường mang gen sản sinh độc tố Shiga (*Sxt2*) và yếu tố bám dính (*eae*). Lâm Đồng là một tỉnh đầu tư phát triển mạnh chăn nuôi bò sữa, bê sữa; tuy vậy bệnh tiêu chảy ở bê sữa vẫn xảy ra phổ biến và gây thiệt hại lớn cho người chăn nuôi do thiếu cơ sở khoa học cho việc phòng và trị bệnh. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm xác định vai trò của vi khuẩn *E. coli* trong bệnh tiêu chảy ở bê sữa và lựa chọn được kháng sinh mẫn cảm để phục vụ cho công tác điều trị bệnh tiêu chảy trên bê sữa tại huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập vi khuẩn *E. coli* trong các mẫu phân bê giai đoạn bú sữa bị tiêu chảy
- Giám định một số đặc tính sinh học của vi khuẩn *E. coli*
- Xác định gen độc ở các chủng vi khuẩn phân lập được
- Xác định độc lực của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen độc tố
- Xác định tính mẫn cảm kháng sinh của những chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen độc phân lập được.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp thu mẫu bệnh phẩm

Khảo sát trên 21 gia trại chăn nuôi bê sữa (quy mô nuôi 3 đến 10 con) tại huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng từ tháng 3 đến tháng 9 năm 2019; thu thập mẫu phân bê bị bệnh tiêu chảy. Thu mẫu phân ở trực tràng mỗi con 3 - 5g cho vào trong túi nilon vô trùng, bảo quản ở 4°C và vận chuyển về phân tích tại Phòng thí nghiệm Vi trùng-Truyền nhiễm, Khoa Chăn nuôi-Thú y, Trường Đại học Nông Lâm Huế.

- Phương pháp phân lập vi khuẩn *E. coli* trong phân bê

Sử dụng phương pháp phân lập vi khuẩn thường quy bằng cách ria cấy mẫu trên môi trường thạch đĩa EMB (Eosin methylene blue agar), sau đó ủ 37°C/24 giờ, chọn những khuẩn lạc có màu xanh mạ ánh kim.

- Giám định các đặc tính sinh vật và hóa học của vi khuẩn *E. coli*

Tiến hành xác định đặc tính sinh vật, hóa học của vi khuẩn *E. coli* trên các môi trường sinh hóa theo mô tả của Nguyễn Như Thanh và cs. (2006).

- Sử dụng phương pháp PCR truyền thống để phát hiện gen độc ở các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được

Mẫu DNA của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ mẫu phân bê được tách bằng phương pháp sốc nhiệt; lấy 0,5 ml dung dịch canh khuẩn nuôi cấy sau 12 giờ ở 37°C, ly tâm, gạn rửa 2 lần bằng dung dịch PBS (pH=7,2), tái huyền phù với 0,2 ml H₂O, đun cách thủy 100°C/5 phút, cho vào đá lạnh và ủ trong 20 phút. Tiến hành ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Loại bỏ cặn và thu dịch nổi chứa DNA sẽ được làm khuôn cho phản ứng xác định gen mã hóa độc tố *Stx2* (Shiga toxin 2), *eae* (intimin).

Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 6,25 µl 2x Go taq green master mix (Promega); 0,5 µl mỗi xuôi (10 pmol/µl); 0,5 µl mỗi ngược (10 pmol/µl); 2 µl DNA khuôn mẫu và 3,25 µl nước tinh khiết. PCR được thực hiện với chu trình luân nhiệt như sau: 95°C trong 5 phút, 30 chu kỳ của 95°C trong 45 giây, 53°C trong 45 giây, 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trong agarose

Bảng 1. Thành phần nucleotide các primer dùng trong phản ứng PCR

Tên primer	Trình tự nucleotide	Sản phẩm PCR (TLTK)
Stx2-F	5'-ATCCTATTCCTCCGGGAGTTTACG-3'	587 bp (Cebula và cs., 1995)
Stx2-R	5'-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3'	
eae-F	5'-CTTTGACGGTAGTTCACTGGACTTC-3'	166 bp (Douglas và cs., 2012)
eae-R	5'-GAAGACGTTATAGCCCAACATATTTTCAGG-3'	

1% trong đệm TAE 1X (40 mM Tris-HCl, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA) ở 100V trong 30 phút. Gel sau khi điện di được nhuộm bằng Ethidium bromide (0,5 µg/ml) trong 15-30 phút trên máy lắc nhẹ. Sản phẩm được hiển thị và chụp ảnh bằng máy GelDoc (Biorad).

- Tiêm truyền động vật thí nghiệm để xác định độc lực của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen mã hóa độc tố

Chuẩn bị canh khuẩn: Chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen độc phân lập được được bồi dưỡng trong môi trường LB ở 37°C, lắc 200 vòng/phút trong 16 giờ. Tiến hành tiêm 0,2ml canh khuẩn *E. coli* đã được chuẩn độ $OD_{600} = 1,2$ vào xoang phúc mạc chuột nhất trắng (18-20g), mỗi chủng vi

khẩn tiêm cho 3 cá thể chuột. Theo dõi thời gian chết và số lượng chuột chết để đánh giá độc lực của vi khuẩn. Mở khám và phân lập vi khuẩn từ gan của chuột bị chết.

- Xác định tính miễn cảm kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán trên thạch

Sử dụng các đĩa giấy tẩm kháng sinh để đánh giá tính miễn cảm kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán trên thạch Mueller Hinton theo mô tả của Quinn và cs. (1994). Đánh giá tính miễn cảm dựa vào đường kính vòng vô khuẩn tiêu chuẩn của Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa, và Công ty TNHH Bioanalyse, Thổ Nhĩ Kỳ cung cấp (bảng 2).

Bảng 2. Kháng sinh sử dụng trong nghiên cứu

Kháng sinh	Nhà sản xuất	Đường kính tiêu chuẩn (mm)
Amoxicillin (10 µg)	Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa	12-22
Gentamicin (30 µg)		19-26
Doxycyclin (10 µg)		18-24
Ceftiofur (30 µg)	Công ty TNHH Bioanalyse (Thổ Nhĩ Kỳ)	24
Oxytetracyclin (30 µg)		24
Enrofloxacin (10 µg)		24

Nếu vòng vô khuẩn \geq đường kính tiêu chuẩn, vi khuẩn miễn cảm (MC) với kháng sinh. Nếu vòng vô khuẩn \leq đường kính tiêu chuẩn, vi khuẩn đã kháng (K) với kháng sinh.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *E. coli* trong các mẫu phân

Chúng tôi đã thu thập được 74 mẫu phân

bê bị bệnh tiêu chảy từ 21 hộ chăn nuôi được chẩn đoán lâm sàng nghi nhiễm *E. coli* (phân trắng) tại huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng, và phân lập được 73 chủng vi khuẩn *E. coli*. Kết quả này cho thấy vi khuẩn *E. coli* tồn tại ở hầu hết các mẫu phân bê bị tiêu chảy (98,65%). Kết quả của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Bá Hiên và Trần Thị Lan Hương (2001), Nguyễn Văn Quang và cs. (2002), các tác giả này đã xác định *E. coli* là vi khuẩn

thường xuyên có mặt trong phân của trâu, bò khỏe mạnh và tiêu chảy với kết quả phân lập được là 100%. Từ các kết quả trên cho thấy vi khuẩn *E. coli* luôn tồn tại trong đường tiêu hoá, chúng có khả năng gây bệnh cho bê khi điều kiện bất lợi như thay đổi pH đường tiêu hoá, có các yếu tố stress, bị lạnh, ăn uống kém; khi đó vi khuẩn *E. coli* phát triển mạnh, phá vỡ cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột và trở thành vai trò chính, đồng thời tiếp nhận các yếu tố gây bệnh được di truyền bằng Plasmid. Điều này cho thấy vi khuẩn *E. coli* đóng vai trò

quan trọng trong bệnh tiêu chảy ở bê. Mặc dù tỷ lệ phân lập cao, để khẳng định các chủng vi khuẩn phân lập được có phải là tác nhân gây bệnh tiêu chảy hay không cần phải kiểm tra gen độc và độc lực trên động vật thí nghiệm.

3.2. Kết quả giám định một số đặc tính sinh vật và hóa học của vi khuẩn *E. coli*

Kết quả giám định một số đặc tính sinh vật và hóa học của tất cả các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả giám định một số đặc tính sinh học của các chủng *E. coli* phân lập được

TT	Thử nghiệm	Số chủng kiểm tra	Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)
1	Tính chất bắt màu Gram âm	73	73	100
2	Sản sinh indol	73	73	100
3	Lên men lactose	73	73	100
4	Lên men glucose	73	73	100
5	Sản sinh H ₂ S	73	0	0,00
6	Phân giải ure	73	0	0,00
7	Khả năng di động	73	73	100

Kết quả từ bảng 3 cho thấy: tất cả các chủng *E. coli* phân lập được là vi khuẩn bắt màu Gram âm (màu hồng); có dạng hình que nhỏ, hai đầu tròn, đứng riêng lẻ, đôi khi xếp thành chuỗi ngắn. Cả 73 chủng này đều có khả năng sinh indol, lên men đường glucose và lactose, có khả năng di động (100%). Tuy nhiên, vi khuẩn không sinh H₂S và không phân giải ure (âm tính 100%). Kết quả giám định đặc tính sinh học của chúng tôi phù hợp với kết quả giám định đặc tính của vi khuẩn *E. coli* mà nhiều tác giả đã công bố (Nguyễn Như Thanh, 1997; Quinn và cs., 1994).

Như vậy, các chủng vi khuẩn phân lập được đều thể hiện các đặc tính sinh học đặc trưng của giống vi khuẩn *E. coli*.

3.3. Kết quả giám định các gen độc tố của vi khuẩn *E. coli*

Trong các loại độc tố của vi khuẩn *E. coli* gây bệnh ở bò, độc tố mã hóa từ gen *Stx2*, *eae* là các loại độc tố phổ biến nhất. Do vậy, việc phát hiện gen mã hóa của các loại độc tố trong vi khuẩn như là một chỉ thị về khả năng gây bệnh của vi khuẩn.

Bảng 4. Kết quả PCR xác định gen mã hóa độc tố ở vi khuẩn *E. coli* (n=73)

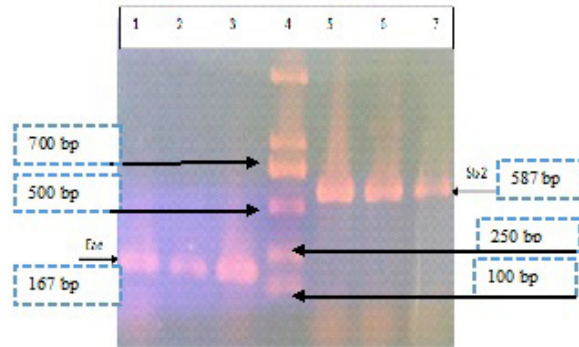
Gen độc tố	Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)
<i>Stx2</i>	3	4,10
<i>eae</i>	13	17,81
<i>Stx2 + eae</i>	1	1,37

Kết quả kiểm tra gen mã hóa độc tố ở bảng 4 cho thấy, trong 73 chủng *E. coli* phân

lập được có 15 chủng mang gen mã hóa độc tố, trong đó 13 chủng mang gen mã hóa độc

tổ *eae* (17,81%), 3 chủng mang gen mã hóa độc tố *Sxt2* (4,10%) và 1 chủng mang cả 2 gen mã hóa độc tố (1,37%). Bùi Thị Ba và cs. (2012) khi tiến hành xác định một số độc tố Shiga trên 34 chủng vi khuẩn *E. coli* đã phát hiện thấy 27 chủng (79,41%) mang gen *Stx1* và 29 chủng (85,35%) mang gen *Stx2*,

trong đó có 22 chủng (64,71%) mang cả 2 gen *Stx1* và *Stx2*. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Đại Lâm và cs. (2014) cho thấy, trong 118 chủng STEC có 52 chủng mang gen *Stx1*, 58 chủng mang gen *Stx2*, 8 chủng mang đồng thời 2 gen *Stx1* và *Stx2*, 6 chủng mang gen *eae*.



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR xác định gen mã hóa độc tố của vi khuẩn *E. coli*
 Giếng 1-3: các mẫu DNA vi khuẩn *E. coli* được khuếch đại bằng môi *eae*
 Giếng 4: DNA marker (100, 250, 500, 750, 1000, 2000 bp)
 Giếng 5-7: các mẫu DNA vi khuẩn *E. coli* được khuếch đại bằng môi *Stx2*

3.4. Kết quả xác định độc lực của các chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen độc tố

Vi khuẩn nếu mang gen mã hóa độc tố nhưng

không biểu hiện thì sẽ không có độc tính thật sự. Vì vậy các chủng mang gen độc sẽ được tiêm truyền cho động vật thí nghiệm để đánh giá độc lực.

Bảng 5. Kết quả kiểm tra độc lực của vi khuẩn *E. coli* mang gen độc tố (n=15)

Thời gian chuột chết (giờ chết sau tiêm)	Số chủng giết chết chuột						Số chủng không giết chết chuột		Phân lập lại vi khuẩn
	Giết 3/3 chuột		Giết 2/3 chuột		Giết 1/3 chuột		Số chủng	Tỷ lệ (%)	
	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)	Số chủng	Tỷ lệ (%)			
8-24	8	53,33	0	0,00	2	13,33	2	13,33	+
25-36	2	13,33	0	0,00	1	6,67	2	13,33	+
Tổng	10	66,67	0	0,00	3	20,00	2	13,33	

Kết quả kiểm tra thể hiện ở bảng 5 cho thấy trong 15 chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen độc tố được phân lập từ phân bê, 10 chủng vi khuẩn có độc lực mạnh do có khả năng gây chết 100% chuột thí nghiệm; 3 chủng vi khuẩn có độc lực yếu, không gây chết quá 50% chuột thí nghiệm. Trong 10 chủng vi khuẩn có độc lực mạnh giết

chết 100% chuột thí nghiệm, có 8 chủng (53,33%) giết chết chuột trong khoảng thời gian 8-24 giờ sau tiêm và 2 chủng vi khuẩn giết chết 100% chuột thí nghiệm trong thời gian sau 24 giờ.

Tiến hành mổ khám chuột chết do gây nhiễm *E. coli* nhận thấy hầu hết gan bị sưng huyết, sưng to; thận, lách tím bầm; ruột viêm, sinh hơi. Lấy

máu tim, gan chuột chết tái phân lập trên môi trường EMB thu được vi khuẩn *E. coli* thuần khiết. Theo Nguyễn Văn Sứ (2005), hầu hết các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được từ bê, nghé bị tiêu chảy đều có độc lực cao, gây chết 75,79% số chuột trong 24 giờ sau khi tiêm. Trong đó các chủng *E. coli* phân lập từ phủ tạng của bê, nghé chết do tiêu chảy có độc lực rất mạnh, gây chết 100% số chuột trong vòng 8 giờ sau tiêm. Còn các chủng phân lập từ phân có độc lực thấp hơn, chỉ gây chết 80% số chuột sau tiêm cho tới 7 ngày. Phạm Quang Phúc (2003) khi xác định độc lực của vi khuẩn *E. coli* phân lập từ bê, nghé bị tiêu chảy cho kết quả là 74,00%. Như vậy, độc lực của 10 chủng *E. coli* chúng tôi kiểm tra cao hơn so với các kết quả trước

đó. Điều này càng khẳng định vi khuẩn *E. coli* là nguyên nhân quan trọng gây ra bệnh tiêu chảy ở bê trên địa bàn huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng.

3.5. Kết quả xác định tính miễn cảm kháng sinh của một số chủng vi khuẩn *E. coli* mang gen độc tố

Vi khuẩn đề kháng kháng sinh là nguyên nhân dẫn đến điều trị bệnh kém hiệu quả, cá biệt một số trường hợp dẫn đến chết. Chọn những chủng vi khuẩn *E. coli* có độc lực cao, giết chết 100% chuột thí nghiệm tiến hành kiểm tra tính miễn cảm với một số kháng sinh được phép sử dụng trong thú y, kết quả thể hiện qua bảng 6.

Bảng 6. Kết quả đánh giá tính miễn cảm kháng sinh của vi khuẩn *E. coli*

TT	Kháng sinh	Số chủng kiểm tra	Miễn cảm		Kháng	
			n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)
1	Amoxicillin	10	5	50	5	50
2	Gentamicin	10	8	80	2	20
3	Doxycyclin	10	3	30	7	70
4	Ceftiofur	10	8	80	2	20
5	Oxytetracyclin	10	1	10	9	90
6	Enrofloxacin	10	9	90	1	10

Kết quả nghiên cứu tính miễn cảm kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* có độc lực cao phân lập được từ phân bê cho thấy vi khuẩn có độ miễn cảm cao với các loại kháng sinh như enrofloxacin (90%), tiếp đến gentamicin và ceftiofur (80%); trong khi đó đề kháng cao với oxytetracyclin (90%), tiếp theo là doxycyclin, có 3 chủng miễn cảm và 7 (70%) chủng kháng. Đối với loại kháng sinh amoxicillin, trong 10 chủng vi khuẩn *E. coli* kiểm tra có 5 (50%) chủng miễn cảm và 5 (50%) chủng kháng với kháng sinh này.

Faibrother (1992) khi thử 11 loại kháng sinh và sulfamid với các chủng *E. coli* phân lập từ gia súc tiêu chảy cho biết khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* tăng dần trên cùng một loại kháng sinh theo thời gian. Nghiên cứu của Nguyễn Bá Hiên và Trần Thị Lan Hương (2001) cho biết có 85% số chủng vi khuẩn *E. coli* miễn cảm với neomycin và ba loại kháng sinh ampicillin, sulfonamide, penicillin hoàn toàn bị vi khuẩn này kháng lại. Các tác giả

Phạm Khắc Hiếu và Bùi Thị Tho (1996) cho biết *E. coli* kháng hoàn toàn với penicillin, sulfonamide và kháng ít nhất với neomycin, furazolidon (hiện nay đã cấm sử dụng) (tỷ lệ kháng chỉ có 17,57% và 12,70%).

Từ các nghiên cứu của nhiều tác giả, chúng tôi nhận thấy khả năng kháng thuốc của vi khuẩn *E. coli* là khá phổ biến, tính kháng thuốc này có sự khác nhau ở mỗi vùng, mỗi thời điểm, mỗi loài động vật, nhưng đều có chiều hướng ngày càng tăng lên về tỷ lệ và chủng loại thuốc bị kháng. Vì vậy, cần phải sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi thú y một cách hợp lý để ngăn chặn hiện tượng kháng thuốc này, đảm bảo cho sự phát triển chăn nuôi bền vững. Với kết quả nghiên cứu trên, khuyến cáo trong điều trị bệnh tiêu chảy do *E. coli* gây ra trên bê tại huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng là có thể dùng 1 trong 3 loại kháng sinh là enrofloxacin (tỷ lệ miễn cảm của *E. coli* là 90%), gentamicin và ceftiofur (tỷ lệ miễn cảm là 80%).

IV. KẾT LUẬN

- Tỷ lệ phân lập được vi khuẩn *E. coli* từ các mẫu phân bê sữa bị bệnh tiêu chảy là 98,65%.

-Tỷ lệ chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được mang gen độc tố (*eae*, *Sxt2*) là 20,55%.

- Vi khuẩn *E. coli* mang gen độc phân lập được có độc lực cao trên chuột nhắt trắng.

- Nên sử dụng các loại kháng sinh có tính miễn cảm cao như enrofloxacin, gentamicin và ceftiofur để điều trị bệnh tiêu chảy bê sữa do *E. coli* trên địa bàn huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Thị Ba, Đào Hoài Thu, Đỗ Văn Tấn, Hoàng Huy Hòa, Vũ Khắc Hưng, 2012. Phân tích một số gen biến thể của độc tố Shiga của vi khuẩn *E. coli* O157:H7 phân lập từ trâu bò khỏe mạnh tại một số tỉnh Nam Trung Bộ. *Khoa học kỹ thuật Thú y, tập XIX, (số 3), tr 33*
2. Lê Minh Chí, 1995. Bệnh tiêu chảy ở gia súc. *Hội thảo khoa học - Bộ Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm, Hà Nội.*
3. Nguyễn Bá Hiên và Trần Thị Lan Hương, 2001. Khả năng miễn cảm của *E. coli*, *Salmonella* phân lập từ gia súc tiêu chảy nuôi tại ngoại thành Hà Nội với một số loại kháng sinh, hóa dược và ứng dụng kết quả điều trị hội chứng tiêu chảy. *Kết quả nghiên cứu KHKT, Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.*
4. Phạm Khắc Hiếu, Bùi Thị Tho, 1996. Kết quả kiểm tra tính kháng thuốc của *E. coli* trong 20 năm. Kết quả khoa học khoa Chăn nuôi thú y, Đại học Nông nghiệp I Hà Nội. *Khoa học Kỹ thuật Thú y, (số 4).*
5. Nguyễn Đại Lâm, Vũ Khắc Hùng, Nguyễn Văn Diên, Hoàng Huy Hòa, Đào Hoài Thu, 2014. Điều tra tình hình nhiễm và phân tích các yếu tố độc lực của vi khuẩn *E. coli* sản sinh độc tố Shiga phân lập từ bò khỏe mạnh tại tỉnh Đăklăk. *Khoa học kỹ thuật Thú y, Tập XXI, (số 2), tr 68.*
6. Phạm Quang Phúc, 2003. *Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ học, vai trò của E. coli gây bệnh tiêu chảy ở bê, nghé tại tỉnh Thái Nguyên và biện pháp phòng trị.* Luận án tiến sỹ nông nghiệp, Hà Nội.

7. Nguyễn Văn Quang, Lê Văn Tạo, Nguyễn Ngã, Nguyễn Thiên Thu, Lê Thị Thi, Đào Duy Hưng, 2002. Độc lực và khả năng gây bệnh trên động vật thí nghiệm của *E. coli* phân lập từ bê, nghé tiêu chảy ở các tỉnh Nam trung bộ. *Khoa học kỹ thuật thú y, tập IX, (số 3).*
8. Nguyễn Văn Sửu, 2005. *Nghiên cứu tình hình tiêu chảy của bê, nghé dưới 6 tháng tuổi tại 3 tỉnh miền núi phía Bắc và xác định một số yếu tố gây bệnh của vi khuẩn E. coli, Salmonella và Clostridium perfringenes phân lập được.* Luận án tiến sỹ nông nghiệp, Hà Nội.
9. Phạm Ngọc Thạch, 1998. *Một số chỉ tiêu lâm sàng, phi lâm sàng ở trâu viêm ruột tiêu chảy và biện pháp phòng trị.* Luận án tiến sỹ nông nghiệp.
10. Nguyễn Như Thanh và Phùng Quốc Chương, 2006. *Phương pháp thực hành vi sinh vật thú y, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.*
11. Nguyễn Như Thanh, Nguyễn Bá Hiên, Trần Thị Lan Hương, 1997. *Vi sinh vật học thú y. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.*
12. Cebula T. A., Payne W. L., Feng P., 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol*, 33, pp. 248–250
13. Douglas J. B., Lucia Galli, Vinoth S., Michael S., Marta R., and Alfredo G. T., 2012. Development of a multiplex PCR assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enterohemorrhagic *E. coli*, and enteropathogenic *E. coli* strains. *Front Cell Infect. Microbiol.* (2), pp. 8
14. Faibrother J.M., 1992. Enteric colibacillosis diseases of swine; *IOWA state University press/ Ames; IOWA U.S.A 7th edition, pp. 489-497.*
15. Smith H.W., 1963. The haemolysins of *Echerichia coli*. *J. Pathol. Bacterial.*, 85, pp. 197-212.
16. Quinn P.J; Catter M.E; Mackey B.K; Catter G.R., 1994. *Clinical veterinary microbiology*, Elsevier Health Sciences. *London, United Kingdom.*

Ngày nhận 22-5-2020

Ngày phản biện 27-8-2020

Ngày đăng 1-11-2020