

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

TỔNG QUAN

10. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU THUỘC LĨNH VỰC CỦA ĐỀ TÀI Ở TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC

10.1. Ngoài nước (phân tích, đánh giá tình hình nghiên cứu thuộc lĩnh vực của đề tài trên thế giới, liệt kê danh mục các công trình nghiên cứu, tài liệu có liên quan đến đề tài được trích dẫn khi đánh giá tổng quan)

Bệnh tụ huyết trùng được Bollinger phát hiện lần đầu tiên trên bò năm 1878 ở Munich (Đức). Những năm tiếp theo bệnh được phát hiện ở khắp mọi nơi trên thế giới, trên nhiều loài gia súc, gia cầm. Bệnh do vi khuẩn *Pasteurella multocida* gây ra thường ở 2 thể chủ yếu là nhiễm trùng huyết, xuất huyết (Haemorrhagic septicaemia) và viêm phổi ở bò (Bovine Pneumonia). Thể viêm phổi ở bò thường gặp tại các nước châu Âu và khu vực Bắc Mỹ, ở Châu Á và Châu Phi thường ở 2 thể chủ yếu, nhiễm trùng huyết, xuất huyết và viêm phổi ở bò (Frank, 1989).

Sau hơn 100 năm kể từ khi phát hiện đến nay, bệnh tụ huyết trùng trâu, bò thể nhiễm trùng huyết, xuất huyết vẫn tồn tại và gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho nhiều nước thuộc khu vực Châu Á, nhất là trâu, bò ở các vùng Đông Nam Á như Việt Nam, Indonesia, Philippin, Thái Lan, Miến Điện, Malaysia... Để khống chế bệnh, đã có khá nhiều công trình nghiên cứu về vi khuẩn *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), bệnh học Pasteurellosis và vắc xin tiêm phòng nhưng vẫn không loại trừ và thanh toán được bệnh, đặc biệt là những nước nhiệt đới, tại các khu vực miền núi địa hình đi lại khó khăn, bệnh tụ huyết trùng vẫn là mối đe dọa thường trực người chăn nuôi. Kết quả nghiên cứu của các công trình nghiên cứu về vi khuẩn *Pasteurella multocida* trên thế giới rất nhiều, chúng tôi nêu một số nghiên cứu và được tóm tắt như sau:

* Nghiên cứu về nguồn bệnh và phương thức lây lan

Tại các ổ dịch cũ, phần lớn những gia súc sống sót sau dịch thường trở thành những con vật mang trùng và thường xuyên bài tiết mầm bệnh ra ngoài ngoại cảnh, tuy nhiên bệnh có thể chưa xảy ra ngay. Thông thường, bệnh chỉ phát ra khi sức đề kháng giảm sút (do cày kéo, lao tác nặng nhọc), hoặc xuất hiện những gia súc cảm thụ mới là những trâu, bò mới sinh sau vụ dịch hay gia súc mới nhập đàn chưa có miễn dịch (De Alwis, 1999).

Trong cơ thể gia súc khỏe mạnh, *P. multocida* ở một điều kiện nhất định, vi khuẩn thường tồn tại ở đường hô hấp trên của vật chủ, đây không phải là quan hệ cộng sinh. Khi sức đề kháng của cơ thể giảm, vi khuẩn tăng độc lực và tác động gây bệnh. Hiramune và De Alwis (1982) cho rằng có một tỷ lệ thấp trâu, bò mang khuẩn ở hầu, họng, mũi. Những con này có hiệu giá kháng thể cao hơn so với con vật không mang trùng và vi khuẩn thông qua dịch tiết niêm mạc mũi bài xuất ra ngoài gây nhiễm cho gia súc khác.

* Nghiên cứu về loài mắc bệnh

Trong tự nhiên hầu hết các loài gia súc, gia cầm, loài có vú và loài chim đều mẫn cảm với bệnh. Theo Lignieres (1900) ít nhất có 6 dạng bệnh tụ huyết trùng khác nhau: Ở gà, trâu, bò, lợn, cừu, dê, ngựa và chó, cả 6 dạng bệnh này đều thấy ở thỏ.

Theo De Alwis (1982) loài vật cảm nhiễm mạnh nhất đối với bệnh tụ huyết trùng là trâu, bò trong đó trâu mẫn cảm hơn bò. Bệnh có thể lây sang lợn, ngựa, chó... nên trong ổ dịch tụ huyết trùng trâu, bò cần chú ý phòng bệnh cho cả lợn, ngựa, chó, cả dê cũng dễ mắc bệnh. Nhiều tác

giả khẳng định: Nơi nào có bệnh tụ huyết trùng trâu, bò thì ở đó người ta cũng phát hiện bệnh này trên động vật hoang dã (voi tại Srilanka, gấu tại Anh, báo tuyết tại Hymalaya) (Carter và CS, 1975). Tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ chết của các loài vật bị bệnh tụ huyết trùng trâu, bò phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: Mức độ cảm nhiễm, sức đề kháng cơ thể, lứa tuổi, mùa vụ...

* Nghiên cứu về tuổi mắc bệnh

Bệnh xảy ra ở hầu hết các lứa tuổi, những con đang bú mẹ ít mắc hơn những con trưởng thành. Trâu, bò 1-3 tuổi dễ mắc hơn trâu bò già và khi mắc thì tỷ lệ chết cao hơn. Trâu bò càng béo, khỏe, trẻ càng dễ mắc bệnh và tỷ lệ chết cao. Bê, nghé dưới 6 tháng tuổi ít mắc bệnh. Theo De Alwis (1984) mức độ cảm nhiễm của động vật non mạnh hơn động vật già. Khi nghiên cứu dịch tại Srilanka tác giả cho biết tỷ lệ mắc bệnh đối với trâu bò dưới 2 năm tuổi là 30-32%, trong khi đó trâu, bò trên 2 năm tuổi chỉ mắc bệnh 3-5% ở bò và 8-9% ở trâu.

* Nghiên cứu về mùa vụ mắc bệnh

Bệnh tụ huyết trùng phụ thuộc rất lớn vào thời tiết, khí hậu. Mustafa và cs (1978) nghiên cứu về ảnh hưởng của mùa vụ tới bệnh tụ huyết trùng đã nhận xét bệnh thường liên quan tới điều kiện khí hậu ẩm ướt. Ở các nước Châu Á bệnh tụ huyết trùng tập trung vào các tháng và mùa khác nhau trong năm. Ở Lào bệnh phát ra từ tháng 4 đến tháng 8, ở Pakistan bệnh xảy ra rải rác quanh năm song thường ở tháng 4 đến tháng 6 hàng năm (FAO, 1991).

* Nghiên cứu về đặc tính sinh học của mầm bệnh

P. multocida là vi khuẩn hiếu khí và yếm khí tùy tiện, ưa kiềm nhẹ, pH=7,2-7,4, có thể nuôi cấy ở nhiệt độ từ 130C đến 380C, thích hợp nhất là 370C

Vi khuẩn *P. multocida* có thể nuôi cấy ở nhiều loại môi trường như: Môi trường nước thịt, môi trường thạch thường. Theo (Jablonski và cs, 1996) để vi khuẩn *P. multocida* phát triển tốt trên môi trường nhân tạo cần thêm một số chất như: cystein, glutamic axit, leucine, methionine, muối vô cơ, nicotinamide, pantothenate, thiamine và đường. Trong đó leucin tác dụng kích thích tăng trưởng. Trên các môi trường nuôi cấy thông thường vi khuẩn phát triển kém, vi khuẩn phát triển tốt hơn trên môi trường nuôi cấy có bổ sung 5-10% huyết thanh hoặc máu động vật.

Đặc tính sinh hóa cơ bản của vi khuẩn tụ huyết trùng như sau

- Dương tính trong các phản ứng Indole, khử Nitrat, Catalase, Oxidase.
- Phân giải lên men các loại đường Glucose, Galactose, Saccarose, Mannose và Levulose.
- Không lên men đường Lactose, Maltose, Ducitol và Rafinose

Prederickson (1973) khi nghiên cứu tính chất sinh hóa của vi khuẩn đã chia *P. multocida* thành 6 type (biotype) dựa trên các phản ứng phân giải các loại đường sau:

- Type 1: Phân giải Arabinose, Ducitol và Xylose
- Type 2: Không phân giải Arabinose, Ducitol và Xylose
- Type 1, 6: Phân giải Xylose
- Type 2, 3, 4, 5: Không phân giải Xylose
- Type 6: Không phân giải Manitol, Sorbitol.

Danh mục các công trình liên quan đến đề tài:

1. Carter. G. R. anh Rundell. S.W. (1975), "Identification of type a strains of *Pasteurella multocida* using staphylococcal hyaluronidase", *Veterinary record*, pp:343.
2. De Alwis M. C. L. (1982), "*Pasteurella multocida* serotype 6:B infection from an elephant", *Sri Lanka Veterinary Journal*, 18, pp. 28.
3. De Alwis M. C. L. (1984), Haemorrhagic septicaemia in cattle and buffaloes, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 3, pp. 707-730.

4. proceedings. No 57

5. Frank G.H. (1989), Pasteurellosis in cattle. In Adlam C. and Rutter M. (eds) Pasteurella and Pasteurellosis, Academic Press London.

6. Jablonki P.E., Jaworski M., Hovde C.J. (1996), "A minimal medium for growth of Pasteurella multocida" FEMS. Microbiol. Lett. 140.

7. Heddleston K. L., Roberts P. A. and Ritchie A. E. (1966), "Immunizing and toxin properties of particulate antigens from two immunogenic types of Pasteurella multocida of African origin", Journal of Immunology, 96

8. Hiramune T. and De Alwis M.C.L (1982), Haemorrhagic septicaemia carrier status of cattle and buffalo in Sri Lanka, Tropical Animal Health and Production 14. pp: 91-92.

9. Ligneres J. M. (1900), Contribution à l'étude et à la classification des septicaemias haemorrhagiques des Pasteurella. Ann. Inst Pasteur (Paris), 15:734.

10. Mustafa A. A., Ghalib H. W. and Shigidi M. T. (1978), "Carrier rate of Pasteurella multocida in cattle associated with an outbreak of haemorrhagic septicaemia in Sudan", British Veterinary Journal.

11. Prederikson W. (1973), Contribution to Microbiology and Immunology. Vol 2 Yerinia. Pasteurella and Francisella

10.2. Trong nước (phân tích, đánh giá tình hình nghiên cứu thuộc lĩnh vực của đề tài ở Việt Nam, liệt kê danh mục các công trình nghiên cứu, tài liệu có liên quan đến đề tài được trích dẫn khi đánh giá tổng quan)

Phan Đình Đỗ và Trịnh Văn Thịnh (1958) cho biết Bệnh tụ huyết trùng ở Việt Nam được phát hiện vào những năm cuối thế kỷ 19: Cudamie thông báo về bệnh ở trâu thuộc tỉnh Bà Rịa và Long Thành năm 1868, sau đó Gemain (1869) phát hiện bệnh ở Gò Công, Yersin phát hiện bệnh ở các tỉnh miền Trung vào các năm 1889-1895. Năm (1901) Shein bằng phương pháp phân lập và tiêm truyền qua động vật thí nghiệm đã xác nhận ổ dịch ở trâu, bò xảy ra ở Tây Ninh là do vi khuẩn *P. multocida*

Kết quả nghiên cứu của Bùi Quý Huy và Trần Hữu Cẩn (1996), Phan Thanh Phương (2000): Bệnh tụ huyết trùng gia súc, gia cầm vẫn là mối đe dọa cho người chăn nuôi, thiệt hại do bệnh chiếm trên 80% trong số thiệt hại do dịch bệnh của trâu, bò. Trong các năm từ 1990-1994 bệnh xảy ra ở 14 thành phố ở trâu, bò trên diện rộng với 1.579 ổ dịch, làm chết 28.331 trâu, bò. Hai năm 1996-1997 bệnh đã bùng nổ ở trên 25 tỉnh, thành. Năm 1999 cả nước có 14.963 trâu, bò mắc bệnh với 2.292 con chết do bệnh. Theo Phan Huy Thụy (2000) ở Vĩnh Phúc trong 3 năm 1997-1999 đã có 212 ổ dịch THT trâu, bò với 1.610 con ốm và 557 con chết.

Trong những năm gần đây đã có một số nghiên cứu về bệnh tụ huyết trùng như Bùi Văn Dũng (2000) nghiên cứu tình hình bệnh tụ huyết trùng và vi khuẩn *P. multocida* phân lập từ dịch ngoáy mũi trâu, bò khỏe ở tỉnh Lai Châu. Hoàng Đăng Huyền (2004) nghiên cứu đặc điểm dịch tễ, các yếu tố ảnh hưởng đến bệnh tụ huyết trùng trâu, bò ở Bắc Giang. Nguyễn Đăng Minh (2005) nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ bệnh THT và xác định tỷ lệ mang trùng Pasteurella ở đàn trâu, bò tỉnh Hà Tây. Đỗ Ngọc Thúy và cs (2007) đã ứng dụng kỹ thuật PCR để xác định Type các chủng vi khuẩn *P. multocida* phân lập từ vật nuôi.

Danh mục các công trình liên quan đến đề tài:

1. Đặng Xuân Bình, Nguyễn Thị Kim Dung, Nguyễn Thị Hà, Lê Bá Hiệp (2010). Khảo sát sự lưu hành của vi khuẩn Pasteurella multocida ở gia súc một số tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam. Tạp chí KHKT Thú y. Tập XVII. Số 2. 2010.

2. Bùi Văn Dũng (2000), Nghiên cứu tình hình bệnh tụ huyết trùng và vi khuẩn Pasteurella phân lập từ dịch ngoáy mũi trâu, bò khỏe mạnh của tỉnh Lai Châu, Luận văn thạc sỹ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.
 3. Bùi Xuân Đồng (2000), "Công tác phòng chống bệnh tụ huyết trùng trâu, bò tại Hải Phòng", KHKT Thú y, 7 (1), Hà Nội, tr. 91-94.
 4. Phan Đình Đỗ và Trịnh Văn Thịnh (1958), Bệnh truyền nhiễm gia súc, những bệnh thường có tại Việt Nam, Nxb Nông thôn, Hà Nội.
 5. Cao Văn Hồng (2002), Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ bệnh tụ huyết trùng trâu, bò, lợn tại Đắk Lắk và một số biện pháp phòng trị, Luận án Tiến sỹ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.
 6. Bùi Quý Huy (1998), "Một số đặc điểm bệnh tụ huyết trùng ở Việt Nam trong những năm vừa qua", KHKT Thú y, 5(1), Hà Nội, tr. 9-94.
 7. Hoàng Đăng Huyền (2004), Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ, các yếu tố ảnh hưởng đến bệnh tụ huyết trùng trâu, bò tại Bắc Giang và đề xuất một số biện pháp phòng chống, Luận án tiến sỹ Nông nghiệp, Viện Thú y, Hà Nội.
 8. Đinh Duy Kháng, Lê Văn Phan, Phan Thanh Phượng, Trương Văn Dung, Hoàng Xuân Nghinh (2000), "Ứng dụng kỹ thuật PCR để định type vi khuẩn Pasteurella multocida ở miền Trung Việt Nam", Tạp chí KHKT Thú y, số 2.
 9. Hoàng Xuân Nghinh, Trương Văn Dung, Hoàng Đăng Huyền (2004), Khả năng đáp ứng miễn dịch của một số vắc xin phòng tụ huyết trùng trâu, bò đang lưu hành ở nước ta. Tạp chí KHKT Thú y. Số 2. 2004.
 10. Nguyễn Đăng Minh (2005), Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ bệnh tụ huyết trùng và xác định tỷ lệ mang trùng Pasteurella ở đàn trâu, bò tỉnh Hà Tây, Luận văn thạc sỹ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.
 11. Phan Thanh Phượng (2000), "Bệnh tụ huyết trùng gia súc, gia cầm và biện pháp phòng chống" Tạp chí KHKT thú y, tập VII, số 2.
 12. Phan Huy Thụy (2000), "Phòng chống bệnh tụ huyết trùng ở trâu, bò ở Vĩnh Phúc", Tạp chí KHKT thú y, tập VII, số 4.
 13. Đỗ Ngọc Thúy, Âu Xuân Tuấn, Cù Hữu Phú, Lê Xuân Tạo (2007), "Ứng dụng kỹ thuật PCR để định Type giáp mô của các chủng vi khuẩn Pasteurella multocida phân lập từ vật nuôi", Tạp chí KHKT thú y, tập XIV, số 1.
- 10.3. Danh mục các công trình đã công bố thuộc lĩnh vực của đề tài của chủ nhiệm và những thành viên tham gia nghiên cứu (họ và tên tác giả; bài báo; ấn phẩm; các yếu tố về xuất bản)
- a. Của chủ nhiệm đề tài
 - [1] Đặng Xuân Bình, Nguyễn Thị Kim Dung, Nguyễn Thị Hà, Phạm Thị Phương Lan, Nghiên cứu xác định vi khuẩn Pasteurella multocida gây bệnh tụ huyết trùng trâu, bò tại Hà Giang, Cao Bằng và bước đầu kiểm nghiệm autovaccine, Tạp chí Khoa học & Công nghệ Đại học Thái Nguyên, Tập 70 số 08, 2010.
 - b. Của những người tham gia thực hiện đề tài
 - [2] Lê Văn Tạo, Cù Hữu Phú, Nguyễn Xuân Huyền, Đặng Xuân Bình (2006). Nghiên cứu chế tạo vac-xin phòng bệnh nhiễm độc tố đường ruột (Enterotoxaemia) gây đột tử trâu bò. Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn. Số 14/2006.
 - [3] Đặng Xuân Bình, Nguyễn Thị Ngân, Phan Hồng Phúc (2007). Tình hình nhiễm Actinobacillus pleuropneumoniae và bệnh viêm phổi-màng phổi ở lợn. Tạp chí KHKT thú y. Số 2.

2007.

[4] Đặng Xuân Bình, Nguyễn Thị Kim Dung, Nguyễn Thị Hà, Lê Bá Hiệp (2010). Khảo sát sự lưu hành của vi khuẩn *Pasteurella multocida* gây bệnh tụ huyết trùng ở trâu bò trên địa bàn một số tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam. Tạp chí KHKT thú y. Tập 17, số 2. 2010.

MỤC TIÊU

12. MỤC TIÊU ĐỀ TÀI

- Xác định đặc điểm dịch tễ bệnh tụ huyết trùng trâu bò tại một số tỉnh miền núi phía Bắc.
- Khảo sát sự lưu hành vi khuẩn *Pasteurella multocida* ở trâu, bò khỏe và trâu, bò nghi mắc bệnh tụ huyết trùng.
- Giám định đặc tính sinh vật hóa học, yếu tố gây bệnh và serotype kháng nguyên của vi khuẩn *Pasteurella multocida* phân lập được.
- Đánh giá mức độ tương đồng giữa kháng nguyên trong vắc xin phòng bệnh tụ huyết trùng trâu, bò và kháng nguyên vi khuẩn *Pasteurella* phân lập được ở trên thực địa.

NỘI DUNG

15. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU VÀ TIẾN ĐỘ THỰC HIỆN

15.1. Nội dung nghiên cứu (trình bày dưới dạng đề cương nghiên cứu chi tiết)

15.1.1. Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ bệnh tụ huyết trùng trâu bò tại Hà Giang và Cao Bằng.

- Tình hình bệnh tụ huyết trùng tại Cao Bằng và Hà Giang từ năm 2012 – 2013.
 - Tần xuất xuất hiện dịch bệnh tụ huyết trùng tại Cao Bằng và Hà Giang từ năm 2012– 2013.
 - Tỷ lệ trâu, bò mắc bệnh và chết do bệnh tụ huyết trùng ở loài gia súc, mùa vụ, lứa tuổi, vùng địa lý.
 - Triệu chứng, bệnh tích đặc trưng ở trâu, bò mắc bệnh tụ huyết trùng.
 - Nghiên cứu mối tương quan của thời tiết khí hậu của Cao Bằng và Hà Giang đến tỷ lệ mắc bệnh tụ huyết trùng ở trâu, bò.

15.1.2. Phân lập và xác định đặc tính sinh vật hóa học của *Pasteurella multocida* trong bệnh tụ huyết trùng trâu, bò tại Hà Giang và Cao Bằng

- Phân lập và xác định đặc tính sinh vật hóa học của *P. multocida* từ dịch ngoáy mũi trâu, bò khỏe trong ổ dịch cũ.
- Phân lập và xác định đặc tính sinh vật hóa học của *P. multocida* từ các mẫu bệnh phẩm của trâu, bò mắc bệnh.
 - Xác định serotype *P. multocida* phân lập được.
 - Xác định độc lực của các chủng *P. multocida* phân lập được.
 - Thử tính miễn cảm với kháng sinh và hoá dược của *P. multocida* phân lập được được.
 - Đánh giá mức độ tương đồng giữa kháng nguyên trong vắc xin phòng bệnh tụ huyết trùng trâu, bò và kháng nguyên *P. multocida* ở trên thực địa.

15.1.3. Đánh giá hiệu lực bảo hộ của một số loại vắc xin phòng bệnh tụ huyết trùng trâu, bò trên thực địa

- Xác định tình trạng miễn dịch chủ động tự nhiên đối với kháng nguyên *Pasteurella multocida* của trâu, bò trong ổ dịch cũ.
 - Đánh giá đáp ứng miễn dịch của trâu, bò sau khi tiêm vắc xin tụ huyết trùng nhũ hóa của Công ty Navetco.
 - Đánh giá đáp ứng miễn dịch của trâu, bò sau khi tiêm vắc xin tụ huyết trùng keo phèn Xí nghiệp

Phùng.

- So sánh sự an toàn và hiệu quả phòng bệnh của hai loại vắc xin nhũ hóa dầu và keo phèn trên thực địa.

15.1.4. Lựa chọn vắc xin và đề xuất biện pháp khống chế bệnh tụ huyết trùng trâu, bò tại Cao Bằng và Hà Giang

15.2. Tiến độ thực hiện

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

14.2. Phương pháp nghiên cứu

14.2.1. Phương pháp thu thập số liệu

* Phương pháp kế thừa các tài liệu cơ bản

Kế thừa có chọn lọc các tài liệu có liên quan tới vấn đề nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước.

* Điều tra thu thập số liệu để đánh giá đặc điểm dịch tễ của bệnh.

Tiến hành điều tra thu thập các thông tin đầy đủ trên hai địa điểm nghiên cứu. Tổng đàn trâu, bò; tổng số con mắc bệnh, tổng số con chết do bệnh tụ huyết trùng.

14.2.2. Phương pháp nuôi cấy, phân lập và xác định vi khuẩn *P. multocida*

* Phương pháp lấy mẫu:

Dịch ngoáy mũi i: Lấy dịch ngoáy mũi trâu, bò khỏe

Bệnh phẩm: Lấy mẫu máu tim, gan, tủy xương trâu, bò nghi mắc bệnh tụ huyết trùng, được bảo quản lạnh đem về phòng thí nghiệm.

* Phương pháp nuôi cấy phân lập

Mỗi mẫu được ria cấy trực tiếp lên các môi trường thông thường và đặc biệt như nước thịt, thạch máu, MacConkey, bồi dưỡng ở 37°C trong 24 giờ. Sau khi vi khuẩn mọc, cấy vào tính chất mọc trên các môi trường để chọn khuẩn lạc điển hình đem nuôi cấy lại trên các môi trường chọn lọc để thuần khiết rồi tiến hành các phương pháp thử sinh hóa để giám định vi khuẩn. Khuẩn lạc của *P. multocida* được xác định theo tiêu chuẩn của Hedleston và cs (1966).

Phân lập *Pasteurella multocida* theo Quinn P.J. et al (1994)

14.2.3. Phương pháp xác định tính chất sinh vật, hóa học của *P. multocida*

* Kiểm tra hình thái vi khuẩn bằng phương pháp nhuộm Gram

Lấy một phiến kính sạch, nhỏ một giọt nước muối sinh lý lên phiến kính, dùng que cấy lấy một khuẩn lạc điển hình, trộn đều vi khuẩn với giọt nước sinh lý. Sau đó cố định tiêu bản trên ngọn lửa đèn cồn. Tiến hành nhuộm Gram và kiểm tra hình thái vi khuẩn dưới kính hiển vi.

* Xác định tính chất sinh vật, hóa học của *P. multocida* bằng cách thử các phản ứng sinh hóa như: phản ứng Oxydaza, phản ứng Catalaza, phản ứng phân hủy Urea, phản ứng sinh Indol, Khả năng lên men đường, khả năng sinh H₂S.

* Phương pháp xác định serotype kháng nguyên của *P. multocida*

Xác định serotype vi khuẩn bằng phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction). Phản ứng sử dụng cặp mồi (Primer sequences).

14.2.4. Phương pháp kiểm tra độc lực của vi khuẩn *P. multocida* phân lập được

* Kiểm tra độc lực của vi khuẩn trên chuột bạch

Sau khi nuôi cấy và tiến hành thuần khiết vi khuẩn phân lập được qua các môi trường nuôi chọn lọc, cấy chủng vi khuẩn thử lên môi trường BHI, bồi dưỡng trong tủ ấm ở 37°C trong 24 giờ tạo điều kiện cho vi khuẩn sản sinh độc tố rồi tiến hành thử độc lực trên chuột thí nghiệm.

Sử dụng chuột bạch (18-22g/con) khỏe, mỗi chủng dùng tiêm 2 chuột, liều tiêm xoang bụng 0,2ml/chuột. Theo dõi chuột chết trong 72 giờ và đến hết 7 ngày.

Chuột chết mổ khám kiểm tra bệnh tích, thu thập bệnh phẩm, nuôi cấy phân lập lại vi khuẩn.

* Làm kháng sinh đồ: Các chủng *P. multocida* phân lập được xác định tính mẫn cảm kháng sinh theo phương pháp của Kirby-Bauer (1980).

Chuẩn bị canh trùng: Các chủng *P. multocida* thử được cấy vào môi trường BHI và bồi dưỡng trong tủ ấm 37°C trong 24 giờ. Lấy 0,5ml canh trùng pha loãng đến hiệu giá 10⁴-4. Dùng pipetman hút 0,2ml canh trùng đã pha loãng nhỏ lên đĩa thạch và láng đều, để 3-5 phút cho khô. Dùng phan đặt nhẹ các khoanh giấy đã tẩm các loại kháng sinh lên trên mặt thạch, cách nhau khoảng 1 cm, bồi dưỡng trong tủ ấm 37°C, sau 18-24h, đo đường kính vòng vô khuẩn theo quy chuẩn để đánh giá tính mẫn cảm hay kháng thuốc.

14.2.5. Xác định tình trạng miễn dịch của trâu, bò khỏe trong các ổ dịch cũ bằng phương pháp ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay)

Thời điểm trước tiêm phòng: trâu, bò trong các ổ dịch cũ, lấy máu tĩnh mạch cổ, để đông tự nhiên trong điều kiện vô trùng ở 4-8°C, chất lấy huyết thanh để xác định hàm lượng kháng thể chủ động tự nhiên đối với bệnh tụ huyết trùng.

Tương tự như trên đối với các mẫu huyết thanh xác định hiệu quả đáp ứng miễn dịch tại các thời điểm sau khi tiêm phòng vắc xin trên cơ sở kiểm tra hàm lượng kháng thể trong mẫu máu trâu, bò thí nghiệm và đối chứng.

14.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu được từ kết quả nghiên cứu sẽ được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học trên phần mềm Minitab và máy tính cá nhân với các thông số thống kê. (Chu Văn Mẫn, 2001)

HIỆU QUẢ KTXH

17. HIỆU QUẢ (giáo dục và đào tạo, kinh tế - xã hội)

- Cung cấp tư liệu khoa học phục vụ các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo trong công tác quản lý phòng trị bệnh tụ huyết trùng trâu, bò trên địa bàn các tỉnh miền núi phía Bắc.
- Bổ sung tư liệu khoa học phục vụ đào tạo.
- Góp phần khống chế hiệu quả bệnh tụ huyết trùng trâu, bò trên địa bàn các tỉnh miền núi phía Bắc.

ĐƠN VỊ SỬ DỤNG

Trên địa bàn 02 tỉnh Hà Giang, Cao Bằng và các tỉnh miền núi phía Bắc có đặc điểm dịch tễ tương đồng.