

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VÀ THỬ NGHIỆM VẮC XIN TẠI CHỖ PHÒNG BỆNH CẦU TRÙNG CHO LỢN Ở THÁI NGUYÊN

TỔNG QUAN

1.1. CẦU TRÙNG KÝ SINH Ở LỢN

1.1.1. Thành phần loài cầu trùng lợn

Cầu trùng là động vật đơn bào có hình tròn, hình trứng, hình bầu dục (phụ thuộc vào từng loài cầu trùng). Cầu trùng ký sinh chủ yếu ở tế bào biểu mô ruột của nhiều loài gia súc, gia cầm và cả ở người. Phân loại cầu trùng ở gia súc, gia cầm, chủ yếu dựa vào đặc điểm về hình thái, kích thước, màu sắc, vị trí ký sinh, thời gian sinh bào tử (<http://www.nongdan.vn>) [85]

Levine và cs (1980) (dẫn theo Lương Văn Huấn và cs, 1997 [7]) và <http://www.taxonomicon.taxonomy.nl> [88] cho biết, cầu trùng ký sinh ở lợn có vị trí trong hệ thống phân loại như sau:

Ngành nguyên sinh động vật Protozoa Goldfuss, 1818

Phân ngành Apicomplexa Levine, 1970

Lớp Sporozoasida Leukart, 1879

Phân lớp Coccidiasina Leukart, 1879

Bộ Eucoccidiorida Léger & Duboscq, 1910

Phân bộ Eimeriorina Léger, 1911

Họ Eimeriidae Minchin, 1903

Giống Eimeria Schneider, 1875

Loài Eimeria betica (Martinez and Hernandez, 1973)

Loài Eimeria deblickei (Douwes, 1921)

Loài Eimeria guevarai (Romeo and Lizcano, 1971)

Loài Eimeria porci (Vetterling, 1963)

Loài Eimeria neodeblickei (Vetterling, 1965)

Loài Eimeria perminuta (Henry, 1931)

Loài Eimeria polita (Pellerdy, 1949)

Loài Eimeria residualis (Martinez and Hernandez, 1973)

Loài Eimeria scabra (Henry, 1931)

Loài Eimeria spinosa (Henry, 1931)

Loài Eimeria suis (Voller, 1921)

Loài Eimeria sp. (Desser, 1978)

Giống Isospora Schneider, 1881

Loài Isospora almataensis (Paichuk, 1953)

Loài Isospora suis (Biester, 1934)

Loài Isospora sp. (Shrivasta and Shah, 1968)

Họ Cryptosporidiidae Tyzzer, 1907

Giống Cryptosporidium Tyzzer, 1907

Loài Cryptosporidium parvum (Tyzzer, 1907)

Arwid Dauschies và cs (1999) [42] đã quan sát hình thái, kích thước, màu sắc, quá trình hình thành bào tử của Oocyst và định danh được 7 loài cầu trùng ký sinh ở lợn, đó là: Eimeria scabra, E. polita, E. perminuta, E. deblickei, E. suis, E. porci và E. spinosa. Tác giả kết luận: căn cứ vào đặc điểm hình thái, kích thước, màu sắc có thể định danh được 98% Oocyst. Tuy nhiên, những

Oocyst có lớp vỏ nhám, xù xì (*E. scabra*, *E. polita*, *E. perminuta*, *E. spinosa*) có thể định danh được ngay mà không cần theo dõi quá trình hình thành bào tử (> 97%); ngược lại, những Oocyst có lớp vỏ nhẵn cần theo dõi thêm quá trình hình thành bào tử thì việc định danh mới chính xác.

Lâm Thị Thu Hương (2004) [9] đã phát hiện 7 loài cầu trùng ký sinh ở lợn tại một số trại chăn nuôi khu vực TP. Hồ Chí Minh, trong đó có 5 loài thuộc giống *Eimeria*: *E. porci*, *E. neodebliecki*, *E. scabra*, *E. perminuta*, *E. debliecki*, 1 loài thuộc giống *Isospora*: *Isospora suis* và 1 loài thuộc giống *Cryptosporidium*: *Cryptosporidium parvum*.

1.1.2. Đặc điểm hình thái, kích thước các loài cầu trùng

Theo Levine (1985) [55], hình thái, kích thước cầu trùng ký sinh ở lợn thuộc hai giống *Eimeria* và *Isospora* như sau:

- *Eimeria debliecki* (Douwes, 1921): đây là loài phổ biến nhất, có độc lực gây bệnh cao nhất và là nguyên nhân chính gây bệnh cầu trùng lợn. *Eimeria debliecki* có 2 dạng Oocyst:

+ Dạng thứ nhất: có kích thước rất lớn 50 x 25 mm, vỏ gồm 2 lớp rõ rệt, không có Micropyle (lỗ noãn), hình trứng, dưới kính hiển vi nhìn thấy các hạt nội nhân rõ rệt. Thời gian hình thành bào tử nang là 7 – 9 ngày.

+ Dạng thứ hai: có kích thước nhỏ hơn 18 – 24 x 15 – 20 mm, nhưng có Micropyle và dưới kính hiển vi không nhìn thấy các hạt nội nhân. Thời gian hình thành bào tử nang là 2 – 3 ngày.

- *Eimeria suis* (Voller, 1921): Oocyst hình elip hoặc hình cầu, kích thước 13 – 20 x 11 – 15 mm, vách nhẵn, không màu, không có Micropyle. Thời gian hình thành bào tử nang là 6 ngày.

- *Eimeria neodebliecki* (Vetterling, 1965): Oocyst hình elip, kích thước trung bình 21,2 x 15,8 mm, không có Micropyle. Thời gian hình thành bào tử nang là 13 ngày.

- *Eimeria scabra* (Henry, 1931): Oocyst có hình bầu dục hoặc hơi có dạng elip, màu vàng nâu. Vỏ có 2 lớp, xù xì tựa như phủ đầy gai. Có lỗ noãn ở phần hẹp của Oocyst. Trong Oocyst có hạt cực. Kích thước 23,2 – 37,8 x 17,4 – 23,7 mm, trung bình là 30,55 – 21,56 mm. Thời gian hình thành bào tử nang là 9 – 12 ngày, trong bào tử có thể cắn. Ký sinh ở đoạn hồi tràng, có khi ở ruột già lợn.

- *Eimeria spinosa* (Henry, 1931): Oocyst hình bầu dục hay hơi kéo dài thành hình elip. Vỏ màu nâu và rất xù xì (toàn bộ mặt ngoài được bảo vệ bởi tập hợp những gai dài khoảng 1 mm), không có Micropyle nhưng có hạt cực. Kích thước 16 – 22,4 x 12,8 – 16,0 mm. Thời gian hình thành bào tử nang là 12 – 15 ngày. Ký sinh ở ruột non lợn.

- *Eimeria guevarai* (Romeo and Lizcano, 1971): Oocyst hình quả lê, kích thước 26 – 32 x 15 – 19 mm, không có Micropyle. Thời gian hình thành bào tử nang là 10 ngày ở nhiệt độ 200C.

- *Eimeria perminuta* (Henry, 1931): Oocyst hình trứng, đôi khi hình cầu, kích thước 11,2 – 16,0 x 9,6 – 12,8 mm, vỏ nhám, màu vàng nâu, không có Micropyle. Thời gian hình thành bào tử nang là 11 ngày.

- *Eimeria scrofae* (Galli – Valerio, 1935): Oocyst hình trụ, kích thước 24 x 15 mm, có Micropyle.

- *Eimeria polita* (Pellerdy, 1949): Oocyst hình elip, kích thước 23 – 27 x 10 – 17 mm, vỏ nhẵn, màu vàng nâu hoặc hồng nâu, không có Micropyle. Thời gian hình thành bào tử nang là 8 – 9 ngày. Ký sinh ở hồi tràng và không tràng lợn.

- *Eimeria porci* (Vetterling, 1965): Oocyst hình trứng, kích thước 18 – 27 x 13 – 18 mm, vỏ nhẵn, không màu và Micropyle không rõ ràng.

- *Eimeria cerdonis* (Vetterling, 1965): Oocyst hình elip, kích thước 26 – 32 x 20 – 23 mm, vỏ nhám, màu vàng đến không màu, không có Micropyle.

- *Isospora suis* (Biester, 1934): Oocyst hình bầu dục hay gần tròn, vỏ có 2 lớp màu vàng sáng và trơn nhẵn. Kích thước 17,4 – 22,3 x 14,5 – 20,3 mm, trung bình 20,78 x 17,31 mm. Có hạt cực.

Thời gian hình thành bào tử khoảng 3 – 5 ngày. Ký sinh ở ruột non, đôi khi ở kết tràng lợn.

- *Isospora almaataensis* (Paichuk, 1953): Oocyst hình bầu dục hay gần tròn. Vỏ trơn nhẵn, màu xám đậm hay xám nhạt. Hạt cực thường có ở những Oocyst gần tròn. Kích thước 24,6 – 31,9 x 23,2 – 29,0 mm. Sau thời kỳ sinh sản bào tử, thể cận hình thành trong bào tử. Thời gian hình thành bào tử là 3 – 5 ngày.

1.1.3. Cấu trúc của Oocyst cầu trùng

Oocyst cầu trùng có nhiều hình dạng, kích thước khác nhau tùy thuộc vào từng loài. Tuy nhiên, phần lớn Oocyst cầu trùng có đặc điểm cấu tạo như sau:

Oocyst màu vàng sáng hoặc không màu, màu vàng nhạt hoặc nâu nhạt. Vỏ ngoài của Oocyst thường nhẵn, cũng có loài vỏ xù xì (*E. spinosa*). Vỏ chia làm 2 lớp: lớp vỏ ngoài dày, vỏ trong mỏng. Hai lớp vỏ ngoài và vỏ trong có thể tách rời nhau dưới tác động của acid H₂SO₄ đặc hoặc bằng cách làm nóng Oocyst trong nước (Monne và Honin, 1954).

Về cấu tạo hoá học: vỏ ngoài là lớp quinone protein, vỏ trong là lớp lipit kết hợp với protein để tạo thành khúc xạ kép (lipoprotein). Nghiên cứu về bản chất hoá học của thành Oocyst, Ryley (1976) [66] cho biết: lớp ngoài của vỏ Oocyst chiếm 20%, có chứa carbohydrat và một protein đặc trưng. Nyberg và Knapp (1976) khi quan sát trên kính hiển vi điện tử thấy lớp ngoài của vỏ Oocyst có thể bị khử bằng dung dịch sodium hypochlorid 2 – 3% trong 15 phút. Scottish, Wang và Mayenhofer (1978) nghiên cứu về bản chất hoá học của thành Oocyst qua xử lý bằng sodium hypochlorid 5% cho rằng, chất này không tác động được đến màng Oocyst còn nguyên vẹn mà chủ yếu tác động đến Micropyle. Lớp trong của vỏ Oocyst chiếm 80%, gồm: một lớp glycoprotein (dày 90 nm), được bao bọc bởi một lớp lipit dày (10 nm). Lớp lipit chủ yếu là phospholipit, chính lớp này bảo vệ Oocyst cầu trùng chống lại sự tấn công về mặt hoá học. Một số loài cầu trùng ở phía đầu nhỏ của Oocyst có một cái "nắp" khúc xạ, gọi là Micropyle (lỗ noãn). Micropyle là vị trí có khe hở của màng bao quanh Macrogamete khi thụ tinh, sau thụ tinh thì khe hở đóng lại, vì vậy nhiều loài không thấy Micropyle nữa. Goodrich (1994) [49] khi nghiên cứu vỏ cấu trúc Oocyst cho rằng, lớp ngoài là vỏ bọc liên tục kể cả khi có Micropyle và sau khi thụ tinh Micropyle đóng lại và không bao giờ mở ra nữa, và đây không phải là con đường mà Sporozoite thoát ra khỏi Oocyst. (Dẫn theo Nguyễn Thị Kim Lan và cs, 2008 [16]).

1.1.4. Chu kỳ sinh học của cầu trùng lợn

1.1.4.1. Chu kỳ sinh học của cầu trùng giống *Eimeria*

* Giai đoạn sinh sản vô tính (Schizogony)

Lợn nuốt Oocyst có sức gây bệnh, vào đến dạ dày, dưới tác động của dịch dạ dày, Oocyst vỡ ra, giải phóng 4 túi bào tử (Sporocyst). Đến ruột non, các bào tử con (Sporozoit) bên trong túi bào tử được hoạt hoá bởi dịch mật và men Trypsin, chúng trở nên hoạt động, phá vỡ lớp màng của túi bào tử và được giải phóng ra. Lập tức, bào tử con xâm nhập tế bào biểu mô ruột và tiến hành sinh sản vô tính. Chúng lớn lên rất nhanh, hình tròn hoặc hình bầu dục, phân chia theo hình thức liệt phân thành nhiều thể phân lập thế hệ 1 (Schizont 1).

Ngay bên trong thể phân lập thế hệ 1, xung quanh mỗi nhân, nguyên sinh chất xuất hiện và bao quanh để hình thành dạng ký sinh trùng nhỏ, hình bầu dục, lúc này chúng được gọi là thể phân lập trung gian (Merozoite). Thể phân lập trung gian phát triển, chúng phá tung tế bào biểu bì nơi chúng khu trú và giải phóng ra rất nhiều Merozoite trưởng thành. Các Merozoite lại lập tức xâm nhập vào các tế bào biểu bì mới để tiếp tục phát triển và trở thành thể phân lập thế hệ mới, gọi là Schizont 2. Quá trình sinh sản vô tính cứ như vậy, được lặp đi lặp lại nhiều lần và tạo ra thể phân lập thế hệ 3, 4, 5....

Mỗi loài cầu trùng khác nhau có giai đoạn sinh sản vô tính khác nhau, hình thành nên các thể phân lập và số thể hệ thể phân lập nhất định khác nhau, sau đó chúng chuyển sang giai đoạn sinh sản hữu tính. (Dẫn theo Nguyễn Thị Kim Lan và cs, 2008 [16]).

* Giai đoạn sinh sản hữu tính (Gametogony)

Giai đoạn sinh sản hữu tính bắt đầu từ thể phân lập thể hệ cuối cùng của cầu trùng. Từ thể phân lập cuối cùng, chúng xâm nhập vào tế bào biểu bì ký chủ để biến thành những thể sinh dưỡng và phát triển thành các giao tử đực, giao tử cái. Giao tử cái (Macrogametocyte) có nhân rất to, chứa nhiều chất dinh dưỡng, ít chuyển động và có lỗ noãn. Giao tử đực (Microgametocyte) nhỏ hơn, nhân cũng nhỏ hơn, chúng chuyển động nhanh nhờ 2 lông roi. Qua lỗ noãn (Micropyle) của giao tử cái, giao tử đực chui vào và thực hiện quá trình thụ tinh tạo hợp tử. Hợp tử được bao bọc bởi một lớp màng bọc, lúc này nó được gọi là noãn nang (Oocyst). Noãn nang có hình bầu dục, gần tròn, hình elip hay quả lê (phụ thuộc vào từng loài). Đến đây, các Oocyst rơi vào lòng ruột và kết thúc giai đoạn sinh sản hữu tính.

Màng vỏ bọc Oocyst gồm 2 lớp, nguyên sinh chất luôn ở dạng hạt. Ở một số loài cầu trùng thấy ở một đầu Oocyst có cả nắp, lỗ noãn, điểm sáng hay hạt cực. Như vậy, tùy từng chủng cầu trùng mà có hình dạng, kích thước Oocyst khác nhau, có hay không có nắp, lỗ noãn, điểm sáng hay hạt cực, cũng như giai đoạn sinh sản bào tử hình thành bào tử hay túi bào tử, có hay không có thể cận trong noãn nang hay trong bào tử (Dẫn theo Nguyễn Thị Kim Lan và cs, 2008 [16]).

* Giai đoạn sinh sản bào tử (Sporogony)

Sau khi Oocyst rơi vào lòng ruột, chúng cùng với phân được thải ra ngoài môi trường và bắt đầu giai đoạn phát triển mới ngoài cơ thể.

Trong điều kiện thiên nhiên khắc nghiệt hoàn toàn khác với môi trường bên trong cơ thể ký chủ, các noãn nang muốn tiếp tục duy trì được sự sống buộc phải thích nghi với điều kiện mới, trong đó nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, không khí... luôn thay đổi. Noãn nang tự bảo vệ bằng cách nhanh chóng tạo ra vỏ cứng, dày, gồm 1 – 2 lớp với màu sắc khác nhau tùy thuộc vào chủng cầu trùng. Sau đó, trong mỗi noãn nang hình thành 4 túi bào tử có hình bầu dục, xung quanh mỗi nguyên bào tử lại được bao bọc một lớp màng mỏng và trở thành túi bào tử. Trong mỗi túi bào tử, nhân của tế bào lại chia đôi về hai phía, được ngăn cách bởi một màng mỏng nữa để trở thành thể bào tử có hình lưới liềm, gọi là bào tử con.

Như vậy, trong quá trình sinh sản bào tử, đối với cầu trùng thuộc giống Eimeria, trong mỗi Oocyst tạo ra 4 túi bào tử, trong mỗi túi bào tử chứa 2 bào tử con. Tất cả 8 bào tử con được bao bọc xung quanh bởi một vỏ cứng dày gồm 2 lớp, gọi là bào tử nang (Oocyst gây bệnh). Chỉ có các Oocyst sau khi trở thành Oocyst gây bệnh mới có khả năng gây bệnh và truyền bệnh từ gia súc này sang gia súc khác (Kolapxki N. A. và cs, 1980 [36]).

1.1.4.2. Chu kỳ sinh học của cầu trùng giống Isospora

Vòng đời của cầu trùng giống Isospora tương tự như giống Eimeria, chỉ khác ở giai đoạn 3 – giai đoạn sinh sản bào tử ở ngoài cơ thể. Trong mỗi Oocyst chỉ hình thành 2 túi bào tử chứ không phải là 4 túi bào tử như giống Eimeria. Nhưng trong mỗi túi bào tử hình thành 4 bào tử con, và tất cả được bọc chung trong vỏ cứng gồm 2 lớp gọi là bào tử nang. Như vậy, kết thúc giai đoạn sinh sản bào tử của cầu trùng giống Isospora cũng tạo ra bào tử nang gồm 8 bào tử con như giống Eimeria.

Oocyst gây bệnh giống Eimeria

Oocyst gây bệnh giống Isospora

Hình 1.1. Cấu trúc Oocyst gây bệnh giống Eimeria và Isospora
(Soulsby E. J. L., 1982 [69])

Richard C. và cs (1996) (dẫn theo Phạm Sỹ Lăng và cs, 2006 [22]) cho biết, thời gian từ khi noãn nang cảm nhiễm xâm nhập vào cơ thể lợn, phát triển trong tổ chức ruột non cho đến khi trưởng thành thải noãn nang ra môi trường khoảng 5 - 7 ngày.

Hình 1.2 Chu trình sinh học của cầu trùng giống Eimeria
(Theo tài liệu của Nguyễn Thị Kim Lan và cs, 2008 [16])

- I. Giai đoạn sinh sản bào tử (Sporogony)
- II. Giai đoạn phát triển thể phân lập (Shizogony)
- III. Giai đoạn sinh sản hữu tính (Gametogony)

1.1.5. Dịch tễ học bệnh cầu trùng

Bệnh cầu trùng là một bệnh khá phổ biến ở các loài gia súc, gia cầm, trong đó có lợn, tuy nhiên tỷ lệ nhiễm cao hay thấp còn phụ thuộc vào các yếu tố tác động của môi trường sống của chúng.

1.1.5.1. Thời tiết, khí hậu ảnh hưởng đến sức sống của Oocyst cầu trùng

Theo Phạm Văn Khuê và cs (1996) [10], có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến sự tồn tại và phát triển của Oocyst cầu trùng.

- Thời tiết, khí hậu là yếu tố rất quan trọng, ảnh hưởng lớn đến sức đề kháng của cầu trùng.

Dương Công Thuận (2003) [34] cho biết, ở các vùng khí hậu khác nhau thì tỷ lệ và cường độ nhiễm cầu trùng có sự khác nhau.

Theo Hoàng Thạch (1996) [27], (1997) [28], bệnh cầu trùng xảy ra quanh năm, nhưng thường tập trung vào các tháng nóng ẩm của mùa xuân và mùa hè. Thời kỳ này, điều kiện thời tiết, khí hậu rất thuận lợi cho Oocyst cầu trùng tồn tại và phát triển ở ngoại cảnh và lây nhiễm cho đàn gà. Môi trường ẩm ướt và nhiệt độ ôn hòa là những điều kiện rất thuận lợi cho sự phát triển của cầu trùng. Vì vậy, mùa xuân và mùa hè gà bị nhiễm cầu trùng nhiều và nặng hơn các mùa khác trong năm, việc phòng bệnh cầu trùng cho gà ở mùa xuân và mùa hè cũng cần chú ý hơn (Dẫn theo Phạm Văn Khuê và cs, 1996 [10]; Nguyễn Thị Kim Lan và cs, 1999 [11]; Dương Công Thuận, 2003 [34]).

Hamadejova K. và cs (2005) [50] cho biết, tỷ lệ nhiễm *Isospora suis* có liên quan đến mùa vụ chăn nuôi, lợn nuôi ở mùa thu có tỷ lệ nhiễm cầu trùng cao hơn mùa hè (29,0% so với 20,0%).

1.1.5.2. Các yếu tố khác ảnh hưởng đến sự tồn tại và nhiễm Oocyst vào vật chủ

- Điều kiện vệ sinh thú y

Khảo sát về tình hình nhiễm cầu trùng ở gà nuôi trong các điều kiện khác nhau, Hoàng Thạch (1996) [27], (1997) [28], (1999) [29] cho thấy, tỷ lệ nhiễm cầu trùng ở gà nuôi lồng là 0,37%, gà nuôi trong chuồng có đệm lót là trấu nhiễm 22,49 – 57,38%. Như vậy, gà nuôi trong lồng không tiếp xúc với phân thì tỷ lệ nhiễm cầu trùng giảm rất thấp.

Tình trạng vệ sinh thú y trong chăn nuôi là một trong những yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến khả năng nhiễm cầu trùng ở vật nuôi.

Theo Morgot A. A. (2000) [37], những cơ sở chăn nuôi có điều kiện chăm sóc tốt, vệ sinh chuồng trại nghiêm ngặt thì tỷ lệ nhiễm cầu trùng là 5 – 10%. Ngược lại, những cơ sở chăn nuôi có điều kiện không đảm bảo thì tỷ lệ nhiễm cầu trùng chiếm 30 – 69%.

Phạm Sỹ Lăng, Phan Địch Lân (2004) [20] cho biết, điều kiện chuồng nuôi và môi trường chăn nuôi bị ô nhiễm sẽ làm cho Oocyst cầu trùng tồn tại và lưu hành lâu dài. Chuồng trại chật chội, ẩm ướt, chất độn chuồng để quá lâu, không được thay đúng định kỳ, bãi chăn thả bị ô nhiễm mầm bệnh là yếu tố quan trọng gây nhiễm cầu trùng cho đàn gà.

Theo Nguyễn Thị Kim Lan và cs (2005) [12], lợn nuôi ở tình trạng vệ sinh thú y kém nhiễm cầu trùng cao (55,45% - 66,30%). Tỷ lệ và cường độ nhiễm giảm rõ rệt ở nhiều đàn lợn nuôi trong tình trạng vệ sinh tốt.

Như vậy, vấn đề vệ sinh chuồng trại và dụng cụ chăn nuôi là yếu tố quan trọng liên quan đến sự tồn tại và nhiễm vào cơ thể vật chủ của Oocyst cầu trùng. (Nguyễn Thị Kim Lan và cs, 2008 [15]).

- Ảnh hưởng của lứa tuổi đến tỷ lệ nhiễm cầu trùng

Theo Driesen S. J. (1993) [47], Roepstorff A. (1998) [64], lợn con ở giai đoạn trước cai sữa nhiễm *Isospora suis* từ 4,5% - 54,0% và nhiễm cao nhất trong giai đoạn 10 – 19 ngày tuổi.

Otten A. (1996) [79], Chae C. (1998) [45] nghiên cứu về ảnh hưởng của lứa tuổi lợn đến tỷ lệ nhiễm cầu trùng cho biết: lợn con trước cai sữa nhiễm *Isospora suis* với tỷ lệ khá cao, 50 – 70% số trại lợn khảo sát có lợn nhiễm cầu trùng.

Driesen (1993) [47] đã kiểm tra phân của 2380 lợn con giai đoạn 5 – 10 ngày tuổi bị tiêu chảy, có tới 53,8% số lợn nhiễm cầu trùng. Lợn bị tiêu chảy chủ yếu ở giai đoạn 7 – 14 ngày tuổi, tập trung cao độ ở 10 ngày tuổi. Từ kết quả nghiên cứu này, tác giả cho rằng, cầu trùng là ký sinh trùng phổ biến gây viêm ruột ỉa chảy ở lợn con từ 5 ngày tuổi đến khi cai sữa.

Một số kết quả nghiên cứu cho thấy, bệnh cầu trùng *Isospora suis* chủ yếu xảy ra ở lợn sữa. Ở Australia, tỷ lệ nhiễm cầu trùng ở lợn sữa là 53,8% (Driesen và cs (1993) [47]). Ở Đức, tỷ lệ nhiễm *Isospora suis* biến động từ 26,9% (Wieler L. H. và cs, 2001 [75]) đến 42,5% (Niestrath và cs, 2002 [60]). Ở Hà Lan, Eysker và cs (1994) [48] đã phát hiện có 36,3% lợn nhiễm *Isospora suis*, trong đó *Isospora suis* nhiễm ở lợn con theo mẹ với tỷ lệ 53,8% - 62,2%. Nghiên cứu trên lợn ở Bắc Âu, Roepstorff và cs (1998) [64] cho biết, trung bình có 17,2% lợn nhiễm *Isospora suis*. Các tác giả đều khẳng định, bệnh cầu trùng xảy ra nặng nhất ở giai đoạn lợn con bú sữa và giảm dần ở giai đoạn sau cai sữa.

Theo Mundt H. C. và cs (2004) [59], bệnh cầu trùng *Isospora* xảy ra chủ yếu ở lợn con 2 tuần tuổi, đôi khi thấy xuất hiện ở lợn 3 tuần tuổi. Kết quả nghiên cứu ở Canada và Anh thấy bệnh xuất hiện nhiều nhất ở lợn con từ 7 – 10 ngày tuổi (Robinson và cs, 1983 [63], Sanford, 1983 [67]). Ở Đan Mạch, Henriksen và cs (1989) [51] cho biết, tỷ lệ nhiễm cầu trùng ở lợn cao nhất ở tuần thứ 2, chiếm tỷ lệ 36,0%. Koudela B. và cs (1986) [78] cũng cho rằng, lợn con nhiễm cầu trùng nhiều nhất ở giai đoạn 11 – 15 ngày tuổi (56,4%).

Lâm Thị Thu Hương (2004) [9] đã kiểm tra 3.698 mẫu phân của lợn từ 4 – 50 ngày tuổi ở các trại chăn nuôi lợn công nghiệp tại TP. Hồ Chí Minh, thấy rằng: tỷ lệ nhiễm *Isospora suis* cao hơn *Eimeria* sp. và *Cryptosporidium*. Lợn trong giai đoạn 8 – 14 ngày tuổi, tỷ lệ nhiễm là 42,70%, cao hơn so với những lứa tuổi lợn khác. Sau 21 ngày tuổi tỷ lệ nhiễm có xu hướng giảm dần. Tỷ lệ nhiễm cầu trùng ở lợn nuôi trên nền xi măng cao hơn rất nhiều so với lợn nuôi trên nền sàn. Tỷ lệ nhiễm *Isospora suis* ở nền xi măng là 52,65%, nền sàn là 35,60%.

Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Kim Lan và cs (2005) [12] cho thấy, tỷ lệ và cường độ nhiễm cầu trùng giảm dần theo tuổi lợn, nặng nhất ở lợn con dưới 2 tháng tuổi.

Theo tài liệu của Phạm Sỹ Lăng và cs (1997) [18], lợn ở các lứa tuổi đều bị nhiễm cầu trùng. Lợn con từ 1 – 4 tuần tuổi thường nhiễm cầu trùng và phát bệnh với tỷ lệ cao hơn lợn trưởng thành. Đặc biệt, lợn ở lứa tuổi 1 – 10 ngày bị bệnh cầu trùng có tỷ lệ chết cao, từ 20 – 40% số lợn bệnh. Lợn nái và lợn trưởng thành, tuy bị nhiễm cầu trùng, nhưng không biểu hiện triệu chứng lâm sàng, là nguồn tàng trữ và truyền bá mầm bệnh trong tự nhiên.

Theo Mundt H. C. và cs (2004) [59], bệnh cầu trùng do loài *Isospora suis* xảy ra ở lợn con đang theo mẹ của tất cả các trại chăn nuôi lợn tập trung trên thế giới.

Xét nghiệm phân của 2.996 lợn con theo mẹ giai đoạn 2 – 47 ngày tuổi từ 8 trại lợn thuộc vùng Ceske Budejovice (Cộng hòa Séc), Hamadejova K. và cs (2005) [50] cho biết, tỷ lệ lợn nhiễm cầu trùng *Isospora suis* là 24,8%, cao nhất ở giai đoạn 13 ngày tuổi (46,3%), tỷ lệ nhiễm ở 2 tuần tuổi là 38,8%.

- Nguồn phát tán Oocyst cầu trùng

Theo tài liệu của Lê Văn Năm (1995) [24], Phạm Văn Khuê và cs (1996) [10], Nguyễn Thị Kim Lan và cs (1999) [11], gia súc, gia cầm bị bệnh cầu trùng là nguồn phát tán Oocyst ra môi trường bên ngoài. Ngoài ra, những con vật mang cầu trùng nhưng không thể hiện triệu chứng lâm sàng là nguồn mang căn bệnh nguy hiểm, vì chúng là đối tượng mà người chăn nuôi ít chú ý (do không thể hiện triệu chứng lâm sàng).

- Đường nhiễm Oocyst vào vật chủ

Sự nhiễm Oocyst có sức gây bệnh chủ yếu qua thức ăn, nước uống, dụng cụ chăn nuôi v.v....

Theo Hunter A. (2002) [35], Oocyst cầu trùng có mặt ở mọi chỗ trong môi trường chăn nuôi. Do vậy, nguy cơ nhiễm cầu trùng rất cao, nhưng có thể tránh được bằng cách đảm bảo cho lợn không tiếp xúc với Oocyst ở môi trường.

Khi con vật bệnh thải Oocyst cầu trùng qua phân, Oocyst được phát tán trên khắp nền chuồng, máng ăn và dụng cụ chăn nuôi, từ đó con vật trực tiếp nuốt phải Oocyst do chính chúng thải ra.

Dụng cụ chăn nuôi, người chăn nuôi, giày, dép, ủng, phương tiện vận chuyển cũng đóng vai trò quan trọng trong việc mang Oocyst cầu trùng từ nơi khác vào chuồng nuôi gia súc, gia cầm, hoặc từ ô chuồng này sang ô chuồng khác (vật nuôi nhiễm Oocyst do những vật nuôi ở nơi khác thải ra).

Mặc dù chưa có dẫn liệu về sự lây truyền cầu trùng lợn qua dụng cụ chăn nuôi, nhưng những nghiên cứu về sự lây nhiễm cầu trùng gà đã được ghi nhận. Bạch Mạnh Điều (1999) [5] đã kiểm tra 420 mẫu xe cải tiến, quang thúm thấy tỷ lệ nhiễm cầu trùng là 4,28%. Hoàng Thạch (1999) [29] khảo sát 250 mẫu từ ủng dùng trong khu chuồng nuôi, tỷ lệ nhiễm là 5,6%; khảo sát 250 mẫu dụng cụ dọn vệ sinh chuồng nuôi, tỷ lệ nhiễm là 11,2%.

Đường lây nhiễm chủ yếu của bệnh cầu trùng là qua hệ thống tiêu hoá. Lợn nuốt phải noãn nang có sức gây bệnh trong thức ăn, nước uống, chuồng nuôi, dụng cụ chăn nuôi sẽ bị nhiễm cầu trùng. Các loài cầu trùng có độc lực gây bệnh khác nhau. Lợn bị bệnh nặng hay nhẹ tùy thuộc vào độc lực của loài cầu trùng mà chúng cảm nhiễm và sự chăm sóc, nuôi dưỡng của người chăn nuôi (Phạm Sỹ Lăng và cs (2002), (2006) [19], [21]).

Vai trò mang và truyền Oocyst cầu trùng đã được một số tác giả đề cập.

Theo tài liệu của Lê Văn Năm (2004) [25], chuột, chó, mèo, chim sẻ và một số côn trùng có thể mang Oocyst từ đàn này sang đàn khác, từ chuồng này sang chuồng khác.

Một số động vật sống trong chuồng nuôi hoặc xung quanh chuồng nuôi có khả năng mang Oocyst cầu trùng, như: ruồi, gián, kiến, chuột. Chúng mang Oocyst cầu trùng ở chân, trên lông, da, cánh.... Trong khi di chuyển, chúng sẽ truyền Oocyst cầu trùng vào thức ăn, nước uống, làm cho gia súc, gia cầm nhiễm cầu trùng (Nguyễn Thị Kim Lan và cs, 2008 [14]).

- Các yếu tố stress: điều kiện chuồng trại chật chội, thức ăn kém dinh dưỡng, thiếu sữa, nhiệt độ môi trường thay đổi, con vật đang mắc các bệnh ký sinh trùng khác hoặc các bệnh truyền nhiễm mãn tính... đều làm sức đề kháng của con vật giảm, dễ nhiễm cầu trùng và dễ bị bệnh.

1.2. BỆNH CẦU TRÙNG Ở LỢN

Bệnh cầu trùng của lợn được Zurn và Rivolta phát hiện lần đầu tiên vào năm 1878, song chưa xác định được căn bệnh và chưa đặt tên bệnh. Bệnh được Douwes mô tả vào năm 1920 và đặt tên cho loài cầu trùng đầu tiên gây bệnh cho lợn là *E. deblickei* vào năm 1921. Trong những năm tiếp theo, các nhà khoa học đã lần lượt phát hiện và đặt tên cho những loài cầu trùng ký sinh, gây bệnh cho lợn ở nhiều nước trên thế giới. (Dẫn theo Phạm Sỹ Lăng và cs, 2006 [22]).

Trịnh Văn Thịnh (1982) [33] cho rằng, loài cầu trùng chính ở lợn là *E. deblickei* (đồng nghĩa với *E. jatimun*, *E. brumpti*). Nhiều loài cầu trùng khác thấy ở lợn là *E. scabra*, *E. perminuta*, *E. spinosa*.

Cầu trùng ký sinh chủ yếu ở tế bào biểu mô đường tiêu hoá của lợn. Bệnh biểu hiện bằng triệu chứng mệt mỏi toàn thân, ăn kém, uống nước nhiều, rối loạn tiêu hoá kèm theo ỉa chảy mạnh, phân thường có máu và cuối cùng chết do kiệt sức (<http://www.thepigsite.cn>) [86], <http://www.nationalhogfarmer.com> [87]).

1.2.1. Thiệt hại về kinh tế do bệnh cầu trùng lợn gây ra

Nghiên cứu về bệnh cầu trùng ở lợn, Nguyễn Thị Kim Lan và cs (2006) [13] cho biết, cầu trùng là một trong những nguyên nhân gây tiêu chảy ở lợn con. Bệnh không gây thành các ổ dịch lớn như các bệnh truyền nhiễm do vi rút, vi khuẩn gây ra nhưng bệnh thường kéo dài, khó loại bỏ nếu như không áp dụng biện pháp phòng trừ tổng hợp.

Lợn bị bệnh cầu trùng thường còi cọc, chậm lớn, khả năng đáp ứng miễn dịch giảm, lợn rất dễ bị nhiễm kế phát các bệnh khác, gây ra những tổn thất không nhỏ cho ngành chăn nuôi như:

- Tỷ lệ chết cao ở lợn con, từ 10 – 20%
- Giảm tốc độ sinh trưởng, tăng trọng kém.
- Tiêu tốn thức ăn và các chi phí khác tăng cao như: chi phí về thuốc điều trị, thuốc sát trùng, chăm sóc nuôi dưỡng. Theo Murray P. K. (1997) [38], năm 1986, việc bán thuốc ký sinh trùng trên toàn cầu ước tính hơn 1,5 tỷ đô la, trong đó có tới 325 triệu đô la cho thuốc trị cầu trùng (Dẫn theo Nguyễn Thị Kim Lan, 2008 [16])
- Lợn con khi bị bệnh cầu trùng mà các kỹ thuật viên không chẩn đoán chính xác nguyên nhân bệnh thì có tới 30 – 50% số gia súc non bị chết, số còn lại còi cọc, chậm lớn.... (Dẫn theo Lê Văn Năm, 2004 [25]).

Theo Johannes Kaufmann, 1996 [54], ở các trại chăn nuôi bị ô nhiễm, tỷ lệ lợn nhiễm cầu trùng có thể tới 50 – 70%, tỷ lệ chết của lợn bệnh từ 20 – 40%.

1.2.2. Cơ chế sinh bệnh

Theo tài liệu của một số tác giả, tác động gây bệnh của cầu trùng phụ thuộc chủ yếu vào số lượng cầu trùng xâm nhập vào cơ thể, vào số lượng tế bào biểu mô đường tiêu hoá bị chúng ký sinh và phá huỷ.

Phạm Văn Khuê và cs (1996) [10] cho biết, cầu trùng xâm nhập vào tế bào biểu mô ruột, gây tổn thương lan tràn niêm mạc ruột, từ đó một số lượng lớn tế bào biểu mô, lớp dưới niêm mạc, các mạch quản, thần kinh bị phá huỷ, tạo điều kiện thuận lợi cho các vi sinh vật phát triển và xâm nhập vào cơ thể.

Theo Kolapxki N. A. (1980) [36], trong màng niêm mạc ruột, cầu trùng phát triển mạnh bằng sinh sản vô tính và làm cho hàng loạt tế bào biểu mô chết. Người ta xác định rằng, một con vật mắc bệnh cầu trùng thải ra môi trường bên ngoài hàng ngày từ 9 triệu đến 980 triệu Oocyst. Điều đó có nghĩa là trong cơ thể con vật ốm, hàng ngày có trên 500 triệu tế bào biểu mô ruột bị phá huỷ. Không những chỉ các tế bào trong đó có cầu trùng ký sinh, mà hình như cả những tế bào bên cạnh, những mao quản và mạch quản bị phá huỷ. Sự phá huỷ hàng loạt tế bào của ký chủ làm cho tính toàn vẹn của vách ruột bị tổn thương. Những vùng ruột bị huỷ hoại làm cho nhiều đoạn ruột không tham gia được vào quá trình tiêu hoá, làm cho con vật thiếu dinh dưỡng dai dẳng, dẫn tới sự ngưng đọng và phù nề các cơ quan và mô bào. Quá trình bệnh thường thể hiện loãng máu, mạch đập chậm. Sự sinh sản mạnh của cầu trùng trong niêm mạc ruột và sự phá huỷ các tế bào biểu mô ruột dẫn tới hậu quả là trên các vùng tế bào bị chết, hệ vi khuẩn gây mù sinh sản, làm nặng thêm quá trình viêm ruột, gây rối loạn chức năng hấp thụ và nhu động của ruột, dẫn đến con vật ỉa chảy.

Conway D. P. và cs (1999) [46] cho biết, chính tổn thương ruột do cầu trùng gây ra đã ảnh hưởng

đến khả năng tăng trọng của vật nuôi.

Williams R. B. và cs (1991) [76] cho thấy, quá trình gây bệnh của cầu trùng giống *Eimeria* là cho hàng loạt tế bào niêm mạc ruột bị phá vỡ, giải phóng Oocyst vào xoang ruột, gây hiện tượng xuất huyết tràn lan, tế bào bong tróc, làm cho thành ruột trở nên mỏng. Oocyst xuất hiện trong phân vào ngày thứ 6.

Khi con vật bị bệnh cầu trùng, lượng hồng cầu và hemoglobin giảm, con vật bị thiếu máu. (Kolapxki N. A. và cs, 1980 [36]).

1.2.3. Triệu chứng của lợn bị bệnh cầu trùng

* Ở lợn con

Lindsay D. S. (2002) [57] cho biết, cầu trùng giống *Eimeria* có ở hầu hết lợn nuôi tại Mỹ trong điều kiện vệ sinh kém, chúng thường gây bệnh ở lợn con 2 – 3 tháng tuổi.

Theo Nguyễn Đức Lưu và cs (2004) [23], tỷ lệ lợn con mắc bệnh cầu trùng từ 50 – 70%.

Lợn con bị bệnh cầu trùng có triệu chứng tiêu chảy mãn tính, tiêu chảy toàn nước hoặc chất nhầy, phân từ vàng đến trắng, mùi hôi thối, biếng ăn, mất nước, có thể nôn. Con vật uể oải, giảm thể trọng (Trương Văn Dung và cs, 2002 [3]).

Lê Văn Năm (2004) [25] cho biết, ở lợn con, bệnh thường xảy ra ở thể cấp tính, tỷ lệ chết cao nếu không được điều trị kịp thời. Sau 5 – 7 ngày ủ bệnh, lợn đột nhiên ủ rũ, mệt mỏi, hay nằm, ít bú và bỏ bú. Sau đó không lâu, chúng ỉa chảy mạnh, phân loãng hoặc nhầy, màu từ vàng đến trắng, mùi khắm và có lẫn máu. Quan sát kỹ thấy lợn bị chướng hơi, đầy bụng, khó chịu, mất nước và có hiện tượng đau bụng, nằm cong lưng. Ngoài ra, có con biểu hiện triệu chứng thần kinh như đi không vững, đi vô hướng hoặc nằm co giật.

Hunter A. (2000) [35] cũng có những mô tả tương tự. Theo tác giả, có tới 20% lợn con mắc bệnh bị chết và triệu chứng chủ yếu là ỉa chảy nhiều.

Đào Trọng Đạt và cs (1995) [4] cho biết, tỷ lệ nhiễm cầu trùng ở lợn là 7,29%; trong đó lợn ỉa phân trắng là 4,20%.

Theo Biester H. E. và cs (1934) [44], lợn con nhiễm *E. deblickei* với số lượng lớn sẽ gây ỉa chảy, kém ăn, sinh trưởng kém và một số lợn bị chết.

Alicata J. E. và cs (1946) [40] cho biết: khi nhiễm 20 – 30 nghìn Oocyst *E. deblickei*, lợn bị ỉa chảy, giảm ăn vào ngày thứ 7 sau khi gây nhiễm và chết sau 15 ngày. WiesenHütter E. (1962) [82], Boch J. và cs (1993) [77] nghiên cứu thấy, lợn con nhiễm 10.000 *E. deblickei* có triệu chứng ỉa chảy và gây yếu.

Khi quan sát phân của lợn có Oocyst loài *E. spinosa*, Andrews J. S. và cs (1952) [41] không thấy lợn có biểu hiện triệu chứng lâm sàng. Nhưng, bằng thực nghiệm gây nhiễm cho lợn 12.000 Oocyst *E. spinosa*, WiesenHütter E. (1962) [81] đã thấy triệu chứng ỉa chảy và sốt nhẹ ở lợn con.

Theo dõi lợn con giai đoạn 2 – 47 ngày tuổi bị bệnh cầu trùng, Hamadejova K. và cs (2005) [50] thấy, biểu hiện lâm sàng chủ yếu là tiêu chảy (39,0%).

Phạm Sỹ Lăng và cs (2006) [21] cho biết, lợn mắc bệnh cầu trùng thường ở lứa tuổi từ 1 – 4 tuần, đặc biệt là lợn từ 7 – 10 ngày tuổi. Vật bệnh bị mất nước, mất máu và rối loạn điện giải, có thể chết do kiệt sức sau 4 – 5 ngày phát bệnh. Lợn con nếu khỏi bệnh cũng phục hồi chậm, giảm tăng trọng so với lợn bình thường. Tỷ lệ chết của lợn bệnh tùy thuộc vào sức đề kháng của cơ thể lợn và điều kiện nuôi dưỡng, chăm sóc.

Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Kim Lan và cs (2006) [13] cho thấy, tỷ lệ và cường độ nhiễm cầu trùng ở lợn phân bình thường và tiêu chảy khác nhau rõ rệt. Lợn bị tiêu chảy có tỷ lệ nhiễm cầu trùng là 56,32%, cao hơn tỷ lệ nhiễm cầu trùng ở lợn có trạng thái bình thường (36,50%). Xét

về cường độ nhiễm, lợn bị tiêu chảy nhiễm cầu trùng nặng hơn nhiều so với lợn phân bình thường.

* Ở lợn lớn

Lợn choai và lợn trưởng thành, thường thể hiện bệnh ở thể mãn tính. Lợn gầy dần, tăng trọng kém, khi nuôi dưỡng kém có thể ỉa chảy. Lợn lớn ít khi chết do bệnh cầu trùng.

Swanson L. E. và cs (1940) [71] cho biết, *E. scabra* và *E. debliciecki* thường gây bệnh ở lợn trưởng thành.

Theo Vetterling J. M. (1966) [73], nếu bị nhiễm *E. debliciecki* liên tục lợn sẽ có triệu chứng lâm sàng ỉa chảy, chậm lớn.

Rommel M. và cs (1967) [80] cho biết, lợn nhiễm Oocyst loài *E. scabra* sẽ làm cho lợn bị ỉa chảy và viêm, xuất huyết ruột non.

Kết quả nghiên cứu của Pellerdy L. P. (1974) [61] cho thấy, lợn có khối lượng 40 kg khi nhiễm *E. scabra* bị tiêu chảy nặng, giảm khối lượng và có thể chết nếu nhiễm số lượng lớn Oocyst có sức gây bệnh.

Phạm Sỹ Lăng và cs (2006) [22] cho rằng, khi lợn mắc bệnh ở thể mãn tính, tính thèm ăn thay đổi không lớn, song tốc độ sinh trưởng của lợn chậm. Lợn nái và lợn trưởng thành bị nhiễm cầu trùng nhưng không biểu hiện triệu chứng lâm sàng, chúng là nguồn tàng trữ và truyền bá mầm bệnh trong tự nhiên.

1.2.4. Bệnh tích của lợn bị bệnh cầu trùng

Nguyễn Thị Kim Lan và cs (2008) [15] cho biết: kiểm tra lợn chết do cầu trùng thường thấy: xác chết gầy còm, bẩn, niêm mạc nhợt nhạt, trắng bệch hoặc xanh tái. Mổ khám lợn chết thấy bệnh tích tập trung chủ yếu ở ruột non. Trong ruột non chứa dịch lỏng, màu nâu hồng, niêm mạc ruột non bị viêm cata, xuất huyết và hoại tử. Kiểm tra chất nạo niêm mạc ruột non thấy vô số cầu trùng ở các giai đoạn phát triển khác nhau.

Vetterling J. M., 1966 [74] đã gây bệnh thực nghiệm ở lợn con bằng *E. debliciecki*. Quan sát thấy lợn có triệu chứng gầy dần, đi táo và lỏng. Mổ khám thấy, thành ruột dày lên, viêm và hoại tử ruột non.

Theo Kolapxki N. A. và cs (1980) [36], màng niêm mạc ruột non viêm cata, khi bị bệnh kéo dài có thể bị viêm xuất huyết không chỉ ở ruột non mà cả ở ruột già. Tại chỗ ruột bị viêm thấy những nốt to bằng hạt kê, xem kính hiển vi các nốt đó thấy có các hợp tử, các thể phân lập.

Mổ khám lợn con chết tại trại Iowa (Mỹ), Lindsay (2002) [57] đã tìm thấy rất nhiều Oocyst của *E. spinosa* trong ruột của lợn, quan sát trên kính hiển vi thấy ruột bị viêm, hoại tử và có rất nhiều Oocyst cầu trùng với đặc điểm: vỏ dày, kích thước 20,4 x 14,2 μm . Tác giả đã kết luận: nguyên nhân chính gây chết ở lợn con tại trại Iowa là do *E. spinosa*.

1.2.5. Chẩn đoán bệnh cầu trùng lợn

Theo Trịnh Văn Thịnh (1978) [32], (1982) [33], Phạm Văn Khuê và cs (1996) [10], để chẩn đoán bệnh cầu trùng cần căn cứ vào triệu chứng lâm sàng, đặc điểm dịch tễ và xét nghiệm phân tìm Oocyst cầu trùng.

Nghiên cứu về bệnh cầu trùng ở lợn, Nguyễn Thị Kim Lan và cs (2008) [14] cho biết: dựa vào tình hình dịch tễ, triệu chứng lâm sàng, xét nghiệm mẫu phân lợn và mổ khám kiểm tra bệnh tích cho phép chúng ta chẩn đoán được bệnh cầu trùng lợn.

Việc chẩn đoán với lợn còn sống có thể căn cứ vào dịch tễ học. Những đặc điểm đáng chú ý là: lứa tuổi mắc, mùa vụ, tình trạng vệ sinh thú y. Triệu chứng của con vật cũng là những hết sức quan trọng trong chẩn đoán bệnh. Những biểu hiện lâm sàng có thể thấy là: tiêu chảy, kém ăn, còi cọc, lông xù. Tuy nhiên, nếu chỉ dựa vào triệu chứng lâm sàng và đặc điểm dịch tễ của bệnh thì khó

chẩn đoán chính xác đó là bệnh gì, vì các bệnh ký sinh trùng thường có biểu hiện lâm sàng tương đối giống nhau. Vì vậy, việc xét nghiệm phân để chẩn đoán bệnh là căn cứ quyết định kết quả chẩn đoán đối với lợn bị bệnh cầu trùng. Phương pháp thường được dùng là phương pháp Fullerborn, Darling..... Phương pháp đếm Oocyst trên buồng đếm Mc. Master cho phép xác định một cách định lượng cường độ nhiễm cầu trùng ở lợn.

Việc chẩn đoán với lợn đã chết được tiến hành qua mổ khám, kiểm tra bệnh tích kết hợp với việc dùng kính hiển vi niêm mạc ruột, soi kính hiển vi để tìm Oocyst và các dạng khác trong quá trình phát triển của cầu trùng.

1.2.6. Phòng, trị bệnh cầu trùng cho lợn

1.2.6.1. Điều trị bệnh

Nguyễn Xuân Bình (1993) [1] và Lê Văn Năm (2004) [25] đã giới thiệu hai chế phẩm phòng chống cầu trùng cho lợn như sau:

+ Anticoccid (Công ty cổ phần thuốc Thú y Trung ương I – VINAVETCO): thuốc bột màu trắng, dễ tan, đóng gói 20 gam.

Thành phần:

Sulfaquinoxalin : 18,7 gam

Diaveridin : 3,3 gam

Lactose vừa đủ : 100 gam.

Liều lượng: 1 g/7 kgTT/ngày, dùng 4 – 5 ngày.

+ Vinacoc. ACB (Cocci – stop – ESB3) (Công ty cổ phần thuốc Thú y Trung ương I - VINAVETCO): thuốc bột màu trắng, đóng gói 20 gam.

Thành phần: Sulphachlopyrazin sodium salt : 30 gam

Lactose vừa đủ : 100 gam.

Liều lượng: 100 mg/kgTT/ngày. Dùng liên tục 3 – 5 ngày.

Hiện nay, trên thị trường có một số loại thuốc khác trị cầu trùng cho lợn:

+ Esb 32% - Anticoccidae: (Công ty dược thú y Thăng Long – THALVET): thuốc bột màu trắng, đóng gói 10 gam.

Thành phần: Trong 1000 gam:

Sulfachloropyridazine sodium : 300.000 mg

Colistin sulfare : 250.000.000 UI

Vitamin K3 : 50.000 mg

Liều lượng: 200 mg/kgTT. Dùng liên tục 1 – 5 ngày

+ Cipcox 2,5% (Công ty Cipla Vetcare - Ấn Độ) có hiệu quả cao trong điều trị bệnh cầu trùng cho lợn. Đây là loại thuốc đặc trị cầu trùng hiệu quả cao, an toàn và ít nhờn thuốc.

Cipcox 2,5% là dung dịch nước uống, màu trắng, hơi sánh.

Trong 100 ml chứa 2,5 g Totrazuril.

Totrazuril là hoạt chất trị cầu trùng mạnh, hiệu quả với tất cả các chủng cầu trùng ruột non và manh tràng.

Cách dùng: Pha nước sạch cho uống

Liều điều trị: 7 mg/kgTT/ngày (dùng liên tục 3 ngày)

1.2.6.2. Phòng bệnh

Từ những kết quả nghiên cứu về bệnh cầu trùng lợn (2006 – 2008), Nguyễn Thị Kim Lan và cs (2008) [14], [15] cho biết, cầu trùng lợn có chu trình phát triển rất nhanh (5 – 13 ngày), Oocyst gây bệnh tồn tại được lâu trong đất (70 – 75 ngày), Oocyst có sức gây bệnh có thể tồn tại 60 – 90

ngày trong nước thải chuồng lợn. Đồng thời, Oocyst bị tiêu diệt trong phân ủ nhiệt sinh học. Theo tài liệu của Lê Văn Năm, 2004 [25], lợn từ 15 đến 90 ngày tuổi nên dùng T. Eimerin hoặc Vinacoc. ACB với liều bằng 1/2 liều chữa, dùng 3 ngày, nghỉ 5 ngày sẽ không những loại bỏ được bệnh cầu trùng mà còn phòng được bệnh phân trắng, chướng hơi, phó thương hàn lợn con. Chuồng trại vào các tháng mưa phùn, lạnh phải khô ráo, thoáng và ấm cho lợn con. Phải rất cẩn thận thực hiện các chế độ dinh dưỡng trong thời gian cai sữa. Tập ăn sớm với thức ăn chuẩn, tăng dần khẩu phần và số lần tập ăn, giảm dần khối lượng sữa và số lần cho bú tối thiểu 7 ngày trước và sau cai sữa; trong thời gian tập ăn nên dùng 1 trong 2 loại thuốc kể trên 3 ngày trước và sau cai sữa. Nếu bệnh xảy ra, phải nhanh chóng báo cho cán bộ có thẩm quyền, có trình độ chuyên môn để có giải pháp dập tắt. Trong thời gian xảy ra bệnh, đàn lợn phải được ăn thức ăn đủ hàm lượng đạm, vitamin và nguyên tố vi lượng. Nguồn nước uống phải sạch sẽ, dồi dào và không được để lợn bị khát.

1.2.7. Vấn đề miễn dịch trong bệnh cầu trùng

Hiện nay, việc chế tạo vắc xin phòng bệnh cầu trùng mới chỉ tập trung chủ yếu ở gia cầm và đã thu được những kết quả nhất định. Ở Mỹ đã phát triển vắc xin sống, vắc xin này là hỗn hợp Oocyst của các loài Eimeria phổ biến nhất.

Vắc xin được pha vào nước uống, nhưng chỉ thuần túy là khống chế việc nhiễm cầu trùng nên trong quá trình chăn nuôi đến một lúc nào đó vẫn phải điều trị. Sau này, vắc xin sống phần lớn bị thay thế bằng các vắc xin an toàn hơn, chế tạo từ các chủng cầu trùng nhược độc trong phòng thí nghiệm đã mất hiệu lực nhưng vẫn sinh miễn dịch.

* Nghiên cứu về miễn dịch cầu trùng ở vật nuôi

Bằng thực nghiệm Tyzzer (1929) [72] đã chứng minh là có 2 mức miễn dịch trong bệnh cầu trùng:

- Mức 1: phát sinh khi con vật nhiễm một lượng nhỏ cầu trùng, khi đó sẽ tạo ra miễn dịch yếu và nếu gây nhiễm cho chúng một liều cầu trùng cao hơn (liều siêu nhiễm) thì chúng sẽ mắc bệnh lại.
- Mức 2: khi con vật nhiễm một lượng lớn cầu trùng, trong trường hợp này sẽ có miễn dịch khi con vật mắc bệnh lại và cường độ miễn dịch có liên quan đến số lượng cầu trùng xâm nhập vào cơ thể.

Bachman (1930) [43] cho rằng: miễn dịch theo tuổi hình thành ở gia súc do chúng tái nhiễm cầu trùng nhiều lần.

Horton Smith (1963) [53] cũng chứng minh điều đó, tác giả nuôi cách ly gà đến 6 tháng tuổi (không cho tiếp xúc với cầu trùng). Sau 6 tháng tuổi, cho nhiễm tự nhiên thì thấy gà rất cảm thụ với E.tenella, nhưng sau đó khi nuôi bình thường thì gà không bị nhiễm E.tenella nữa.

Wiesnhiiter E và cs (1962) đã cho gây nhiễm thực nghiệm E.debliecki, thấy lợn thải Oocyst từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 14, rồi không thấy thải Oocyst nữa cho đến khi nhiễm lại lần thứ hai. Nếu 3 – 4 tuần sau lại cho lợn nuốt một lượng lớn Oocyst cầu trùng nữa thì số lượng Oocyst thải ra thấp hơn lần thứ nhất. Để có được tính miễn dịch vững chắc phải cho nuốt hàng ngày ít nhất 100 ngày.

Romel và cs (1970) đã nghiên cứu phản ứng miễn dịch với E.scabra thấy: Huyết thanh miễn dịch có tác dụng ngăn cản sự nhiễm Oocyst cầu trùng nhưng không thành công lắm. Tuy vậy, bằng phương pháp hóa chất Paramethazone acetate và Dexamethazone cũng đã ngăn cản sự nhiễm cầu trùng.

* Tính đặc hiệu của miễn dịch cầu trùng Eimeria sp

Tyzzer (1929) [72] đã xác định rằng: tính đặc hiệu của miễn dịch cầu trùng ở vật nuôi là có thật. Để chứng minh cho khẳng định của mình ông đã gây nhiễm cho gà bằng E.tenella lần 1 và tiếp

tục gây nhiễm lần 2 cách lần đầu hai tuần với 3 loài cầu trùng là *E.tenella*, *E.maxima* và *E.acervulina*. Khi mổ khám ông chỉ phát hiện thấy bệnh tích ở ruột non (nơi gây bệnh của *E.maxima* và *E.acervulina*) mà không thấy bệnh tích ở manh tràng (nơi gây bệnh của *E.tenella*). Bên cạnh đó, thành phần kháng thể đặc hiệu chống cầu trùng dạng dịch thể đã được làm sáng tỏ bởi những nghiên cứu của Stotish R.L và Wang (1997) [70]. Qua nhiều thực nghiệm, các tác giả nhận thấy *E.debliecki* nhiễm cho lợn sẽ kích thích sản sinh ra kháng thể đặc hiệu, chủ yếu là IgG và IgM.

Đồng thời, cùng với những nghiên cứu trên, Rose M.E (1962) [65] đã chứng minh tính đặc hiệu theo loài rất nghiêm ngặt ở *Eimeria* bằng phương pháp kết tủa trên thạch.

* Cơ chế đáp ứng miễn dịch cầu trùng

Theo cơ chế đáp ứng miễn dịch chung: muốn có kháng thể phải có kháng nguyên kích thích cơ thể. Trong thực tiễn, sự sống của động vật luôn diễn ra quá trình tiếp nhận các dạng kháng nguyên nhưng không phải tất cả đều hình thành kháng thể. Miễn dịch cầu trùng *Eimeria* chỉ hình thành khi có sự hiện diện của cầu trùng *Eimeria* (Lillehoj S.H., 1996 [56]).

Ví dụ minh họa dưới đây biểu hiện rõ hơn về các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên.

Kháng nguyên CT loài 2

Kháng nguyên CT loài 1

Kháng thể kháng CT loài 2

Kháng thể kháng CT loài 1

Hình 1.3: Cơ chế đáp ứng miễn dịch trong bệnh cầu trùng

Nguyễn Ngọc Lanh (1982) [17] cho biết: bản chất của đáp ứng miễn dịch bao gồm đáp ứng miễn dịch tế bào và đáp ứng miễn dịch dịch thể.

- Đáp ứng miễn dịch tế bào

Theo Horton Smith và cs (1963) [53], phản ứng tế bào biểu bì ruột thờ với cầu trùng như sau: một phần tế bào biểu bì cuộn vào bên trong, cách ly khỏi cầu trùng làm cho các giao tử của cầu trùng khó kết hợp với nhau. Theo tác giả, các Merozoite trong tế bào biểu bì ruột đã kích thích sự hình thành kháng thể.

Kolapxki N.A và cs (1980) [36] cho rằng: Trong bệnh cầu trùng có thể miễn dịch tế bào đóng vai trò chủ yếu.

Nhiconxki (1971) cũng nhận định: Cơ sở miễn dịch của vật nuôi là sự tác động trực tiếp của kháng nguyên và theo Turh (1975) thì trạng thái cơ thể có vai trò quan trọng ảnh hưởng đến đáp ứng miễn dịch.

Lellehoj S.H. (1996) [56] cho biết, miễn dịch tế bào đóng vai trò chính trong việc chống lại cầu trùng và sự tương hỗ tế bào bạch cầu ở ruột với cầu trùng là đặc trưng cho đáp ứng miễn dịch cầu trùng.

- Đáp ứng miễn dịch dịch thể

Hệ thống miễn dịch hỗn hợp ở ruột gồm: Các tế bào thực thể, các tế bào điều hòa miễn dịch và các tế bào hiệu ứng miễn dịch. Lympho ruột được tạo ra từ nhiều tổ chức khác nhau như: các hạch

hạnh nhân, mảng peyer, túi thừa mackei và các chùm lympho nằm rải rác dọc nội bì và lamina propria của đường ruột. Mảng peyer đóng vai trò quan trọng trong việc tổng hợp IgA và tiểu quần thể lympho B là những thành phần quan trọng trong việc tiết IgA.

Adams D.O và Hamilton T.A (1984) [39] cho biết: Vai trò thực bào của đại thực bào rất quan trọng trong việc ức chế sự di chuyển của Schizont. Tế bào lympho B có vai trò quan trọng tạo ra kháng thể dịch thể. Dưới sự kích thích của Merozoite và Schizont cùng với sự hỗ trợ của tế bào lympho T, các tế bào lympho B phân chia rồi biệt hóa thành tế bào plasma (tương bào). Các tương bào tiết ra kháng thể chống lại các Merozoite và Schizont. Ngoài các nhân tố trên thì cytokin và lymphokin cũng có vai trò quan trọng trong tạo miễn dịch đối với vật nuôi.

Theo Tô Long Thành (2006) [30], đáp ứng miễn dịch dịch thể là đáp ứng miễn dịch được thực hiện bởi các kháng thể. Kháng thể có trong các dịch thể của cơ thể như: máu, dịch nhầy, nước mắt, nước bọt.

Đáp ứng miễn dịch dịch thể được khởi phát khi:

- + Một tế bào trình diện kháng nguyên "nuốt" kháng nguyên vào
- + Kháng nguyên được chế biến
- + Kháng nguyên đã được chế biến được trình diện trên bề mặt các tế bào cùng cấu trúc bề mặt đã biết là phân tử MHC
- + Các tế bào T đáp ứng đặc hiệu phản ứng với kháng nguyên được trình diện cùng với các phân tử MHC thông qua thụ cảm quan đặc hiệu với kháng nguyên của chúng.
- + Các tế bào T- hỗ trợ hoạt động như các tế bào hỗ trợ bằng cách tiết ra các lymphokin có tác dụng kích thích sự tăng sinh tế bào B và thải tiết kháng thể.

Ngăn chặn và loại bỏ các cầu trùng ngoại bào

Giết và loại bỏ các tế bào bị nhiễm

Cầu trùng

Các cầu trùng ngoại bào

Các cầu trùng bị đại thực bào nuốt vào

Các cầu trùng nội bào nhân lên trong tế bào biểu mô ruột

Hoạt hóa các đại thực bào giết các cầu trùng đã
ăn vào

Dưới đây là cơ chế chung về đáp ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch qua trung gian tế bào.

Hình 2.6. Cơ chế về đáp ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch qua trung gian tế bào

Như vậy, để có thể đáp ứng miễn dịch của vật nuôi đối với bệnh cầu trùng thì phải kể đến vai trò to lớn của đại thực bào, rồi đến bạch cầu đa nhân trung tính, bạch cầu ái toan, bạch cầu ái kiềm. Ngoài nhiệm vụ thực bào và tiêu diệt cầu trùng thì đại thực bào còn đóng vai trò trong việc tạo miễn dịch đặc hiệu, nó tiếp nhận kháng nguyên, chia cắt kháng nguyên thành siêu kháng nguyên rồi trình diện cho các tế bào có thẩm quyền miễn dịch. Các tế bào lympho B sau khi nhận diện kháng nguyên cầu trùng, một nhóm sẽ tạo ra kháng thể đặc hiệu để kháng cầu trùng, một nhóm khác có vai trò là các tế bào "trí nhớ miễn dịch" để khi cầu trùng xâm nhập vào lần sau thì kháng thể được sinh ra nhanh hơn và nhiều hơn. Đây chính là cơ sở để chế tạo vắc xin phòng bệnh cầu trùng. Các tế bào lympho T sinh ra lymphokine để tiêu diệt cầu trùng, một số đóng vai trò trong điều hòa miễn dịch, một số nguyên bào lympho T miễn cảm cũng trở thành "tế bào nhớ".

* Các yếu tố ảnh hưởng đến đáp ứng miễn dịch cầu trùng ở vật nuôi

Tyzzer (1929) [72] bằng kỹ thuật gây bệnh thực nghiệm đã chứng minh cường độ miễn dịch không đồng đều, phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: loài gây bệnh, đường xâm nhập vào cơ thể và trạng thái sức khỏe vật nuôi. Những loài cầu trùng gây bệnh ở tầng sâu thường kích thích cơ thể sản sinh kháng thể mạnh hơn những loài cầu trùng chỉ ký sinh ở bề mặt niêm mạc. Xâm nhiễm qua quá trình tiêu hóa tự nhiên kích thích sinh miễn dịch tốt hơn tiêm thẳng vào ruột, sức khỏe vật nuôi tốt thì đáp ứng miễn dịch tốt hơn khi ốm đau.

Ngoài ra, liều gây nhiễm cũng có vai trò hết sức quan trọng. Với liều thích hợp có tác dụng kích thích khả năng hình thành miễn dịch, liều quá cao có thể gây ức chế miễn dịch, thậm chí phát bệnh.

Paskin P.I (1980) đã gây bệnh cho gà con bằng một liều nhỏ nang trứng (1 – 5000 Oocyst/gà) thì thấy gà mắc bệnh không có triệu chứng. Khi nhiễm lần thứ hai với liều 50.000 Oocyst/gà thì gà bị cầu trùng rất nặng, có thể bị chết.

* Thời gian hình thành và duy trì miễn dịch

Tyzzer (1929) [72] đã xác định: Miễn dịch được tạo ra tương đối bền vững đối với loài cầu trùng phát triển sâu trong mô bào, miễn dịch kém bền vững với loài cầu trùng chỉ phát triển ở trong lớp

biểu bì niêm mạc ruột.

Theo Horton Smith (1963) [53], thời gian miễn dịch tương đối dài nhưng phụ thuộc vào nhiều yếu tố, nhất là phương pháp gây miễn dịch.

Rahmat (1995) [62] nhận thấy, thời gian miễn dịch dài hay ngắn còn tùy thuộc vào sự tồn tại của cầu trùng.

Ở Việt Nam, nghiên cứu của nhóm tác giả Trần Tích Cảnh và cs (1996) [2] cho biết: Miễn dịch ở gà với *E. tenella* có thể duy trì 60 ngày. Đây là kết quả rất có ý nghĩa, mở ra hướng nghiên cứu và chế tạo vắc xin cầu trùng.

Theo Tô Long Thành (2006) [30], bằng cách sử dụng một số lượng kháng nguyên cố định và huyết thanh hay các dịch sinh học với các độ pha loãng khác nhau, có thể định lượng được hoạt tính của kháng thể có trong các dịch thể đó. Hiệu giá kháng thể cao (độ pha loãng cao nhất của huyết thanh còn cho phản ứng dương tính trong một phản ứng huyết thanh) thường là chỉ thị sự phơi nhiễm hoặc đáp ứng miễn dịch mới xảy ra và có thể liên quan đến sự phòng chống lại bệnh tật.

Trong thực tế, sau khi nhiễm bệnh một thời gian ngắn, hiệu giá kháng thể sẽ tăng cao và đó là kết quả của sự đáp ứng miễn dịch dịch thể.

Euzeby. J (1981) đã nghiên cứu thời gian duy trì miễn dịch đối với cầu trùng *Eimeria* sp. từ 12 – 14 tháng. Tác giả cho rằng, sự bảo hộ tại chỗ là có thật và có thể duy trì đến hàng tháng, thậm chí hàng năm. Miễn dịch này không nhất thiết là điểm xuất phát của sự sản sinh kháng thể tại chỗ, nhưng chắc chắn là yếu tố kích thích để huy động kháng thể.

Rose M. E và cs (1962) [65] đã chứng minh tính miễn dịch đặc hiệu nghiêm ngặt theo loài ở *Eimeria* bằng phương pháp kết tủa trên thạch.

Long P. L và Millard B. J (1979) [58] cho biết: thời gian tác động của *Eimeria* để hoàn thành sự hình thành kháng thể ở gà thứ 9 (ngày thứ 4), nhưng có thể phát hiện sức đề kháng sau ngày thứ 3 (72 giờ sau gây nhiễm).

Song những nghiên cứu của các nhà khoa học trong nước mới chỉ dừng lại với việc nghiên cứu về tình hình nhiễm cầu trùng, đặc điểm dịch tễ, đặc điểm bệnh lý lâm sàng, cách phòng trị tổng hợp mà chưa nghiên cứu chế tạo được một loại vắc xin nào phòng bệnh cầu trùng lợn. Bạch Mạnh Điều (2004) [6] đã nghiên cứu, chế tạo thử nghiệm vắc xin cầu trùng gà và đã đạt được những kết quả bước đầu. Tác giả đã xác định được mức Krad phù hợp khi chiếu xạ làm giảm độc lực của Oocyst cầu trùng gà (21 – 25 Krad).

MỤC TIÊU

- Xác định tình hình nhiễm cầu trùng lợn ở tỉnh Thái Nguyên.
- Nghiên cứu chủng cầu trùng có độc lực cao và ổn định, chế tạo và thử nghiệm vắc xin tại chỗ phòng bệnh cầu trùng cho lợn dưới 2 tháng tuổi ở tỉnh Thái Nguyên.

NỘI DUNG

1. Tình hình nhiễm cầu trùng ở lợn tại tỉnh Thái Nguyên
2. Nghiên cứu chế tạo vắc xin tại chỗ phòng bệnh cầu trùng cho lợn

2.1. Xác định loài cầu trùng có độc lực cao

- Xác định các loài cầu trùng ký sinh ở lợn nuôi tại tỉnh Thái Nguyên.
- Xác định độc lực các loài cầu trùng phân lập được từ lợn ở tỉnh Thái Nguyên.

2.2. Chế tạo vắc xin

- Tạo sinh khối kháng nguyên cầu trùng
- Chiếu xạ để giảm độc lực của Oocyst cầu trùng
- Chế vắc xin từ Oocyst đã chiếu xạ

3. Kiểm tra hiệu lực và thử nghiệm vắc xin

3.1. Thử nghiệm để xác định khả năng bảo hộ của vắc xin cầu trùng đối với lợn.

3.2. Sử dụng vắc xin tại chỗ phòng bệnh cầu trùng cho lợn ở tỉnh Thái Nguyên.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nghiên cứu tình hình nhiễm cầu trùng lợn ở tỉnh Thái Nguyên

1.1. Phương pháp lấy mẫu xét nghiệm

Bố trí lấy mẫu theo phương pháp lấy mẫu chùm nhiều bậc. Việc thu thập mẫu được tiến hành ngẫu nhiên tại các hộ chăn nuôi lợn ở 9 huyện, thành của tỉnh Thái Nguyên.

Tiến hành lấy mẫu phân mới thải của lợn với lượng phân 100 - 200 g/mẫu. Để riêng từng mẫu phân vào mỗi túi nilon nhỏ có ghi nhãn: Thời gian lấy mẫu, địa điểm, giống, trạng thái phân và biểu hiện lâm sàng của lợn.

Các mẫu được xét nghiệm ngay trong ngày hoặc xét nghiệm sau khi bảo quản theo quy trình bảo quản mẫu trong nghiên cứu ký sinh trùng.

1.2. Phương pháp xét nghiệm mẫu

* Dùng phương pháp Fulleborn

- Nguyên lý: Lợi dụng sự chênh lệch tỷ trọng giữa noãn nang cầu trùng và dung dịch nước muối bão hòa có thể trọng nặng hơn, để phân ly noãn nang ra khỏi phân và làm noãn nang nổi lên bề mặt dung dịch.

- Cách tiến hành: Lấy 5 - 10g phân cho vào cốc thủy tinh nhỏ, dùng thìa thủy tinh nghiền nát, vừa nghiền vừa đổ nước muối bão hòa vào khoảng 40 - 50 ml, sau đó lọc qua lưới thép bỏ cặn. Lấy dung dịch vừa lọc được cho vào ống nhỏ, để yên tĩnh trong 20 - 30 phút. Dùng vòng thép vớt màng mỏng trên bề mặt, cho lên phiến kính để quan sát dưới kính hiển vi, hoặc có thể đổ dung dịch vừa lọc vào ống nghiệm đầy đến tận miệng, đặt phiến kính lên trên sao cho tiếp xúc với dung dịch. Để khoảng 20 - 30 phút, sau đó lấy phiến kính ra soi trên kính hiển vi để tìm Oocyst cầu trùng.

* Phương pháp thu nhận và bảo quản Oocyst cầu trùng

Nguyên lý thu Oocyst: Dựa vào sự chênh lệch tỉ trọng riêng của Oocyst cầu trùng với dung dịch làm nổi, dùng nước muối bão hòa và hiệu ứng vận tốc quay li tâm để tách Oocyst theo trình tự:

+ Thu Oocyst: Phân chứa Oocyst được hòa với nước muối bão hòa gấp 10 lần, khuấy tan phân trong dung dịch, sau đó lọc qua lưới lọc loại bỏ cặn thô. Huyền dịch thu được cho vào máy li tâm 500 vòng/phút trong 5 phút, lấy phần nước phía trên có chứa Oocyst. Tách Oocyst ra khỏi dung dịch nước muối bão hòa bằng cách cho thêm nước cất với lượng tương đương, sau đó cho vào máy quay li tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút, gạn bỏ nước đi, thu Oocyst ở đáy ống nghiệm.

+ Rửa Oocyst: Thêm nước cất vào ống ly tâm, khuấy tan cặn có Oocyst, cho vào máy quay ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 5 phút. Gạn nước giữ lại phần cặn, làm lặp lại 2 lần, thu Oocyst.

+ Nuôi Oocyst trong dung dịch Bicromat Kali 2,5% để Oocyst phát triển thành Oocyst gây bệnh. Xác định thời gian Oocyst sản sinh bào tử.

1.3. Phương pháp xác định các loài cầu trùng

* Định loài cầu trùng theo khóa định loài của Levine N.D. (1985) [55] dựa vào kích thước (đo bằng thước vi thị kính), hình thái, màu sắc, lỗ noãn, cấu tạo vỏ Oocyst (quan sát trên kính hiển vi ở độ phóng đại 400 lần) và thời gian sản sinh bào tử.

- Dùng thước vi thị kính đo kích thước của Oocyst cầu trùng qua kính hiển vi quang học với độ

phóng đại 400 lần. Chụp và ghi lại hình ảnh của Oocyst dưới kính hiển vi.

2.4.1.4. Phương pháp xác định cường độ nhiễm

Cường độ nhiễm cầu trùng được xác định bằng cách đếm số Oocyst trong 1g phân bằng buồng đếm Mc.Master và quy định các cường độ nhiễm: nhẹ, trung bình, nặng, rất nặng.

Theo Chae C. (1998) [45], cường độ nhiễm cầu trùng được quy định như sau:

- 5.000 Oocyst/g phân: Cường độ nhiễm nhẹ (+).
- > 5.000 - 10.000 Oocyst/g phân: Cường độ nhiễm trung bình (++)
- > 10.000 - 15.000 Oocyst/g phân: Cường độ nhiễm nặng (+++)
- > 15.000 Oocyst/g phân: Cường độ nhiễm rất nặng (++++)

2. Nghiên cứu chế tạo vắc xin tại chỗ phòng bệnh cầu trùng cho lợn

2.1. Phương pháp xác định loài cầu trùng có độc lực cao

Xác định loài cầu trùng có độc lực cao bằng phương pháp gây nhiễm cho lợn thí nghiệm.

Chọn 3 loài cầu trùng phân lập ở lợn tại Thái Nguyên: *E. debliecki*, *E. neodebliecki*, *E. scabra* (Theo một số tác giả thì đây là 3 loài cầu trùng có độc lực cao và gây bệnh cầu trùng cho lợn), gây nhiễm cho 3 nhóm lợn, mỗi nhóm bằng một loài cầu trùng trên.

Ngoài ra, có một nhóm lợn dùng làm đối chứng (Không cho nuốt Oocyst cầu trùng).

* Phương pháp và liều gây nhiễm

Dùng Oocyst cầu trùng có sức gây bệnh để gây nhiễm cho lợn khoẻ 25 – 30 ngày tuổi theo phương pháp của Shirley M. W. (1995) [68]. Mỗi loài cầu trùng gây nhiễm với liều: 10.000 – 15.000 Oocyst.

Từ kết quả gây nhiễm và diễn biến bệnh lý, lâm sàng của lợn gây nhiễm, xác định được loài cầu trùng có độc lực cao.

2.2. Phương pháp tạo sinh khối kháng nguyên cầu trùng

- Thu nhận Oocyst của lợn gây nhiễm theo phương pháp của Bessay (1995).
- Nuôi Oocyst trong môi trường Bichromat kali (K-2-Cr-2-O7-) 2,5% (trong điều kiện 26 – 28°C ở độ sâu không quá 1 cm, có lắc đảo thường xuyên để cung cấp oxy) cho đến khi Oocyst hoàn thành giai đoạn sinh bào tử (có sức gây bệnh).

2.3. Xác định liều chiếu xạ thích hợp

- Dùng Oocyst đã được rửa sạch 3 lần trong nước cất. Chuẩn độ Oocyst và chiếu xạ ở 3 liều xạ (Mỗi loài cầu trùng được chọn chiếu xạ ở 3 mức: 10,05; 15,03 và 21,01 Krad, máy chiếu xạ R. PP. 150) theo phương pháp của Trần Tích Cảnh và cs (1996) [2].

- Xác định liều chiếu xạ giảm độc Oocyst cầu trùng phù hợp:

Dùng Oocyst được chiếu xạ ở các mức chiếu xạ khác nhau gây nhiễm cho lợn. Liều chiếu xạ phù hợp là liều làm cho Oocyst không còn khả năng gây bệnh cho lợn nhưng vẫn còn đặc tính kháng nguyên và có tác dụng kích thích cơ thể tạo kháng thể chống cầu trùng khi có cầu trùng xâm nhập vào đường tiêu hóa lợn.

+ Cho lợn thí nghiệm nuốt Oocyst giảm độc lúc 10 ngày tuổi với số lượng 10.000 – 15.000 Oocyst/lợn.

+ Sau 15 ngày nuốt Oocyst, công cường độc cho lợn để kiểm tra khả năng miễn dịch của lợn.

2.4. Chế vắc xin

Từ những Oocyst chiếu xạ ở liều chiếu xạ thích hợp và chất bổ trợ, chế vắc xin cầu trùng.

Kiểm tra mật độ Oocyst trong vắc xin bằng buồng đếm Mc. Master, điều chỉnh sao cho trong 1 ml vắc xin có bình quân 10.000 – 15.000 Oocyst (theo Shirley, 1995 [68]).

2.5. Xác định liều vắc xin có khả năng phòng bệnh cho lợn

- Bố trí thí nghiệm theo phương pháp phân lô so sánh: Lô thí nghiệm sử dụng vắc xin, lô đối chứng không dùng vắc xin.
- Sử dụng cho lợn 10 ngày tuổi các liều vắc xin với lượng Oocyst khác nhau (10.000, 15.000, 20.000, 30.000 Oocyst/ lợn). Cho vắc xin qua đường miệng.
- Sau 2 tuần dùng vắc xin, tiến hành công cường độc bằng liều cao Oocyst cầu trùng có độc lực.

Đánh giá kết quả:

- + Nếu lợn phát bệnh thì liều vắc xin chưa đủ gây miễn dịch.
- + Nếu lợn không phát bệnh thì liều vắc xin đã đủ gây miễn dịch.

Từ đó, xác định được liều Oocyst đủ gây miễn dịch cho lợn.

3. Nghiên cứu thử nghiệm khả năng phòng bệnh của vắc xin

- Bố trí thí nghiệm theo phương pháp phân lô so sánh: lô thí nghiệm được dùng vắc xin phòng bệnh, lô đối chứng không dùng vắc xin.
- Sau 15 ngày dùng vắc xin, công cường độc cho lợn ở 2 lô. Đánh giá kết quả:

- + Nếu lợn phát bệnh thì vắc xin chưa có tác dụng phòng bệnh.
- + Nếu lợn không phát bệnh thì vắc xin đã có tác dụng phòng bệnh.

Từ đó, xác định được tác dụng phòng bệnh của vắc xin tự chế.

4. Sử dụng vắc xin tự chế phòng bệnh cầu trùng cho lợn ở tỉnh Thái Nguyên

Sử dụng vắc xin tự chế phòng bệnh cầu trùng cho lợn ở một số hộ chăn nuôi lợn tại 9 huyện, thành của tỉnh Thái Nguyên.

- + Bố trí thí nghiệm theo phương pháp phân lô so sánh: Lô thí nghiệm được dùng vắc xin phòng bệnh, lô đối chứng không dùng vắc xin.
- + Lô thí nghiệm và lô đối chứng là những đàn lợn con 7 – 14 ngày tuổi, là con của những lợn mẹ nhiễm cầu trùng (qua kết quả kiểm tra phân), đồng thời những đàn lợn con này tương đối đồng đều về các yếu tố khác như: ngày tuổi, khối lượng, điều kiện vệ sinh thú y...

* Từ kết quả xét nghiệm phân, chọn những lợn mẹ nhiễm chủ yếu, riêng lẻ mỗi loài cầu trùng: E. deblickei hoặc E. neodeblickei. Sau đó, sử dụng vắc xin tương ứng để phòng cho đàn con của những lợn mẹ đó. Cụ thể:

Vắc xin loài E. deblickei phòng cho đàn con của lợn mẹ nhiễm chủ yếu loài cầu trùng E. deblickei.
Vắc xin loài E. neodeblickei phòng cho đàn con của lợn mẹ nhiễm chủ yếu loài cầu trùng E. neodeblickei.

* Chọn những lợn mẹ nhiễm cả 2 loài cầu trùng: E. deblickei và E. neodeblickei. Sử dụng vắc xin hỗn hợp 2 loài tương ứng để phòng bệnh cho đàn con của những lợn mẹ này.

5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập được xử lý trên phần mềm Excel 2003 theo phương pháp nghiên cứu trong chăn nuôi (Nguyễn Văn Thiện (2000) [31]).

5.1. Các tính trạng định tính như: tỷ lệ nhiễm, cường độ nhiễm cầu trùng được tính theo công thức:

- Số trung bình cộng:

Trong đó: m: số lợn nhiễm cầu trùng hoặc số lợn (-) sau điều trị

n: tổng số lợn có trong mẫu

- Sai số của số trung bình

Trong đó: và : là sai số của p và q

p và q: là tỷ lệ % các thành viên có và không có đặc điểm nghiên cứu

n: là dung lượng mẫu

5.2. Các tính trạng định lượng như số lượng Oocyst cầu trùng/gam phân, số lượng Oocyst/vi trường kính hiển vi.... được tính theo công thức:

- Số trung bình cộng:

Trong đó: : tổng các giá trị của X

n: dung lượng mẫu

- Độ lệch tiêu chuẩn:

- Sai số của số trung bình (với $n \leq 30$)

Trong đó: : Sai số của số trung bình

: độ lệch tiêu chuẩn

n: dung lượng mẫu

5.3. So sánh mức độ sai khác giữa hai số trung bình

* Đối với các tính trạng định lượng như số lượng Oocyst cầu trùng/gam phân, số lượng Oocyst/vi trường kính hiển vi, các bước tiến hành như sau:

- Bước 1. Tính

+ Trường hợp mẫu nhỏ và $n_1 + n_2 < 30$; $n_1 \neq n_2$

Trong đó: và : số trung bình của nhóm 1 và nhóm 2

n_1 và n_2 : dung lượng mẫu của nhóm 1 và nhóm 2

S_1 và S_2 : độ lệch tiêu chuẩn của nhóm 1 và nhóm 2

+ Trường hợp mẫu nhỏ và $n_1 = n_2$

Trong đó: và là số trung bình của nhóm 1 và nhóm 2

+ Trường hợp $n_1 + n_2 > 30$

- Bước 2: tìm ứng với độ tự do g và các mức xác suất khác nhau: 0,05 – 0,01 và 0,001 ($g = n_1 + n_2 - 2$)

- Bước 3: So sánh với để tìm xác suất xuất hiện giá trị hoàn toàn do ngẫu nhiên sinh ra.

- Bước 4: Xác định mức độ sai khác nhau giữa hai số trung bình

* Đối với tính trạng định tính như tỷ lệ nhiễm, cường độ nhiễm cầu trùng, công thức tính là:

Trong đó: và là tỷ lệ nhiễm cầu trùng của nhóm 1 và nhóm 2.

và là sai số của và

và là dung lượng mẫu của nhóm 1 và 2

Các bước tiếp theo cũng tiến hành như đối với tính trạng định lượng.

HIỆU QUẢ KTXH

3.1.1. Kết quả nghiên cứu về tình hình nhiễm cầu trùng lợn của tỉnh Thái Nguyên đã giúp người chăn nuôi lợn ở tỉnh Thái Nguyên có thêm những hiểu biết về tỷ lệ và mức độ nhiễm cầu trùng ở lợn.

Tỷ lệ lợn nuôi tại 9 huyện, thành, thị thuộc tỉnh Thái Nguyên nhiễm cầu trùng với tỷ lệ cao (48,19%); nhiễm ở cường độ từ nhẹ đến rất nặng, trong đó nhiễm ở cường độ nặng và rất nặng chiếm 18,54%. Lợn nuôi ở huyện Định Hóa có tỷ lệ và cường độ nhiễm cầu trùng cao nhất (63,19%) và thấp nhất ở TP. Thái Nguyên (29,77%). Kết quả được thể hiện ở bảng 3.1, mục 3.1. Như vậy, tỷ lệ và cường độ nhiễm cầu trùng ở lợn có sự khác nhau giữa các huyện, thành, thị. Ở những huyện có điều kiện địa lý phức tạp, vùng sâu, vùng xa, người dân chăn nuôi với phương thức tận dụng thức ăn, điều kiện vệ sinh thú y không đảm bảo đều nhiễm cầu trùng với tỷ lệ khá cao. Từ kết quả nghiên cứu này, chúng tôi có khuyến cáo người chăn nuôi lợn cần chú ý nhiều hơn đến công tác vệ sinh thú y trong chăn nuôi và thay đổi tập quán chăn nuôi lạc hậu.

3.1.2. Bằng việc tách Oocyst cầu trùng từ mẫu phân lợn và gây nhiễm Oocyst cầu trùng với các mức liều khác nhau cho lợn, đã định danh được 7 loài cầu trùng ở lợn, trong đó có 3 loài cầu trùng có độc lực cao, đó là: *E. debliecki*, *E. neodebliecki*, *E. scabra*. Tuy nhiên, loài *E. debliecki*, *E. neodebliecki* có độc lực cao hơn so với loài *E. scabra* (100% số lợn gây nhiễm phát bệnh so với 60% số lợn gây nhiễm phát bệnh). Kết quả được trình bày ở bảng 3.2, 3.3, mục 3.2.1, 3.2.2 và các hình ảnh 3.1 – 3.10.

3.1.3. Từ kết quả xác định các loài cầu trùng có độc lực cao, chúng tôi đã sử dụng Oocyst loài *E. debliecki*, *E. neodebliecki* để chiếu xạ ở các liều 10,05 Krad, 15,03 Krad, 21,01 Krad nhằm làm giảm độc lực. Kết quả cho thấy, với mức 15,03 và 21,01 Krad chiếu xạ có tác dụng giảm độc lực của Oocyst cầu trùng, làm cho lợn có miễn dịch và không bị bệnh khi công cường độ. Kết quả được trình bày ở bảng 3.4, mục 3.3 và ảnh 3.11.

3.1.4. Công cường độ cho những lợn không mắc bệnh để xác định Oocyst của liều chiếu xạ 15,03 Krad và 21,01 Krad đã xác định được mức 15,03 Krad có khả năng kích thích cơ thể sản sinh kháng thể và có sức miễn dịch với cầu trùng tốt hơn mức 21,01 Krad. Vì vậy, có thể sử dụng liều chiếu xạ 15,03 Krad để chế vắc xin cầu trùng lợn. Kết quả được trình bày ở bảng 3.5 và mục 3.3.

3.1.5. Kết quả nghiên cứu xác định số Oocyst giảm độc đủ khả năng gây miễn dịch cho lợn trong một liều vắc xin cho thấy, số lượng Oocyst/liều vắc xin đơn loài *E. debliecki* hoặc *E. neodebliecki* là 15.000 – 20.000 và vắc xin hỗn hợp hai loài là 20.000 – 30.000 cho kết quả bảo hộ là 100%. Kết quả được trình bày ở bảng 3.6, 3.7, mục 3.4.

3.1.6. Sử dụng lợn 7 ngày tuổi, 14 ngày tuổi, 21 ngày tuổi và 30 ngày tuổi cho dùng vắc xin đã xác định được thời điểm 7 và 14 ngày tuổi dùng vắc xin là hiệu quả nhất, tỷ lệ bảo hộ đạt 100%, trong khi đó ở các lứa tuổi còn lại tỷ lệ bảo hộ chỉ đạt 33,33%. Kết quả được trình bày ở bảng 3.8, mục 3.5.

3.1.7. Theo dõi 27 lợn 10 – 15 ngày tuổi sử dụng vắc xin đơn loài và vắc xin hỗn hợp 2 loài, thấy thời gian bắt đầu có khả năng bảo hộ tốt nhất là từ 20 ngày sau khi dùng vắc xin. Kết quả được trình bày ở bảng 3.9, mục 3.6.

3.1.8. Kết quả bảng 3. 10, 3.11, 3.12, 3.13 mục 3.7 cho thấy:

Thử nghiệm vắc xin đơn loài và vắc xin hỗn hợp 2 loài phòng bệnh cầu trùng cho lợn ở 9 huyện, thành, thị của tỉnh Thái Nguyên đã làm giảm đáng kể tỷ lệ nhiễm cầu trùng ở lợn. Sau 20 ngày dùng vắc xin, xét nghiệm phân chỉ thấy có 6,11% - 9,50% lợn nhiễm cầu trùng khi sử dụng vắc xin đơn loài) và 3,93% lợn nhiễm cầu trùng khi sử dụng vắc xin hỗn hợp 2 loài. Trong khi đó tỷ lệ nhiễm cầu trùng ở những lợn không được sử dụng vắc xin là 40,19% - 43,75%.

ĐƠN VỊ SỬ DỤNG

Các nông hộ, các trại chăn nuôi lợn gia đình ở 9 huyện, thành thuộc tỉnh Thái Nguyên: TP. Thái

Nguyên, TX. Sông Công, các huyện: Đồng Hỷ, Phổ Yên, Phú Bình, Phú Lương, Định Hoá, Đại Từ và Võ Nhai.