

# RESULTS OF SURVEY ON FLUKES OF PARAMPHISTOMATIDAE FAMILY IN CATTLE, BUFFALOES AND THE EFFICACY OF DRUGS AGAINST THESE FLUKES

(Summary)

Results of survey have shown that: The number of flukes varied between 1000 and 10,000 flukes per animal. Most of them were found in rumens. The prevalence in various herds varied between 72 and 83%. High egg numbers (30 - 600 eggs per gram of faeces) were found in over 80% of infected animals. Okazan (Oxychlorzanide) 15 mg/kg has a low efficacy against paramphistomatidae (37.5%). A combination of Okazan 7.5mg/kg + Levamisol 10 mg/kg reached a higher efficacy level (62.50%).

## KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH NGUYÊN NHÂN GÂY BỆNH ĐỐM ĐỎ CÁ TRẮM CỎ, ĐẶC TÍNH SINH VẬT HOÁ HỌC CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN PHÂN LẬP ĐƯỢC VÀ CHỌN CHỦNG CHẾ VACXIN PHÒNG BỆNH

NGUYỄN NGỌC NHIÊN, CÙ HỮU PHÚ, PHẠM NGỌC SƠN,  
ĐÀO THỊ HẢO, ĐỖ NGỌC THỦY

Trong khoảng 2 thập niên gần đây, trên thế giới, bắt nguồn từ châu Á xảy ra "hội chứng lở loét" ở cá (EUS: Epizootic Ulcerative Syndrome). Hội chứng này xảy ra ở cá nuôi và cá tự nhiên, lây lan với tốc độ rất nhanh và làm thiệt hại lớn cho nghề cá trên thế giới.

Hiện nay, ở Việt Nam đã xuất hiện một loại bệnh có nhiều đặc điểm tương tự hội chứng lở loét ở cá, và nó phát triển mạnh trên cá trắm cỏ vùng đồng bằng sông Hồng. Khi bị bệnh, trên mình cá có chấm đỏ xuất huyết, dần dần vẩy khô, rụng, gãy. Cá thường bị chết rải rác. Tên địa phương gọi bệnh này là bệnh đốm đỏ.

Nghiên cứu các chủng vi khuẩn gây ra bệnh này từ đó chọn chủng chế vacxin bảo vệ đàn cá cho dân là mục tiêu đề tài của chúng tôi.

### I. NGUYÊN LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

**Nguyên liệu:** Các bệnh phẩm (gan, thận, ruột, nốt loét, lách) thu từ cá có triệu chứng và bệnh tích của cá mắc bệnh.

**Môi trường phân lập và giám định vi khuẩn** của hãng Oxoid sản xuất.

**Phương pháp:** Là các phương pháp thường quy hiện áp dụng ở các phòng nghiên cứu vi trùng.

### II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

a) **Kết quả phân lập vi khuẩn gây bệnh đốm đỏ trên cá trắm cỏ:** Chúng tôi đã thu thập 126 bệnh phẩm trong các vùng nuôi cá đang có dịch bệnh và đưa vào phân lập xác định vi khuẩn *Aeromonas*. Kết quả phân lập cho thấy có 74 mẫu dương tính tỷ lệ 58,7% (74/126). Tìm hiểu yếu tố thời tiết với khả năng gây bệnh cho thấy, tất cả các mẫu lấy ở các tháng khác nhau đều phân lập được vi khuẩn *Aeromonas*, nhưng giữa các tháng có sự khác nhau về tỷ lệ, tháng 4 có tỷ lệ 68,4%, tháng có tỷ lệ thấp nhất là tháng 8 chỉ chiếm 30,0%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với một số kết quả của các nghiên cứu khác đã công bố (Hà Kỳ 1996, Bùi Quang Tề 1998).

b) **Kết quả xác định một số đặc tính sinh vật, hoá học của vi khuẩn phân lập:** Đặc điểm hình thái vi khuẩn: Kết quả kiểm tra cho thấy, các vi khuẩn có dạng trực khuẩn, hai đầu tròn, kích thước từ 0,8 - 1,8µm thường đứng riêng rẽ, bắt màu gram âm và có khả năng di động.

**Đặc tính nuôi cấy:** Sau 24h nuôi cấy vi khuẩn ở 37°C, chúng tôi nhận thấy trong môi trường nước thịt thường, vi khuẩn phát triển làm đục môi

trường, lác nhẹ có vẩn mây lơ lửng và có mùi hôi đặc trưng. Trong môi trường Mac Conkey, khuẩn lạc hình tròn đường kính 1 - 1,5mm, màu vàng nhạt, bề mặt khuẩn lạc lồi, rìa khuẩn lạc nhẵn. Trong môi trường thạch máu, vi khuẩn gây dung huyết mạnh. Trong môi trường Rimler-Shotts, khuẩn lạc có màu vàng da cam. Môi trường Rimler-Shotts được coi là môi trường đặc trưng nuôi cấy vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*. Trong môi trường Gelatin, vi khuẩn có phản ứng dương tính, làm tan chảy Gelatin.

Đặc tính nuôi cấy của các chủng vi khuẩn phân lập được thể hiện rất rõ ở những tính chất đặc trưng của *Aeromonas hydrophila* mà các tác giả đã nghiên cứu vi khuẩn này đã miêu tả.

**Đặc tính sinh hoá:** Kết quả theo dõi nội dung này cho thấy, 100% số chủng nghiên cứu đều có hình gậy, có khả năng di động, bắt màu Gram âm. Tất cả các chủng đều gây dung huyết trên môi trường thạch máu và mọc trên môi trường Mac Conkey. 100% số chủng có phản ứng Oxidaza, Catalaza dương tính, phân huỷ Gelatin và sinh Indol. Tất cả các chủng đều cho phản ứng Urea âm tính. Với phản ứng sinh H<sub>2</sub>S chỉ có 10/12 chủng cho phản ứng dương tính, chiếm tỷ lệ 83,3%.

Kết quả thử phản ứng lên men một số loại đường cho thấy, 100% số chủng vi khuẩn phân lập được lên men đường Galactose, Glucose, Arabinose, 83,3% lên men đường Sucrose, 66,7% lên men đường Mannitol, 50% lên men đường Fructose và đường Maltose, 33% lên men đường Lactose, 25% lên men đường Sorbitol và không lên men đường Inositol.

c) **Kết quả xác định độc lực của vi khuẩn phân lập được trên động vật thí nghiệm:** Thử độc lực trên chuột: Chọn 12 chủng vi khuẩn trong các chủng phân lập được sau khi đã được xác định các đặc tính sinh vật hoá học đã được dùng để xác định độc lực của chúng trên chuột bạch.

Kết quả thử cho thấy, với liều tiêm 0,2 ml/chuột, sau tiêm 16 - 26h chuột chết. Có 9 trong số 12 chủng gây chết 100% chuột, chiếm tỷ lệ 75%, trong đó có chủng A2, cả 2 chuột được tiêm canh khuẩn đều chết sau 16 giờ, còn chủng A5 chỉ có 1/2 chuột chết sau 26 giờ theo dõi. Chủng A7 và A9 giết 1/2 số chuột sau 24h. Như vậy là cả 12 chủng phân lập được từ cá mắc bệnh đều có độc lực gây chết chuột. Các chuột chết được mổ khám và có biểu hiện bệnh tích: Gan thận đều bị nát mủn. Nội quan xuất huyết đều có mùi tanh. Cấy máu tim của các chuột chết trên môi trường thạch máu thấy khuẩn lạc của vi khuẩn gây dung huyết mạnh.

Thăm dò độc lực của vi khuẩn *Aeromonas* phân lập được trên cá trắm cỏ: Trong nội dung này chúng tôi chọn chủng vi khuẩn A2 để tiêm cho cá với liều lượng 1 ml canh trùng nguyên/con. Cá thí nghiệm gồm 7 lô, 6 lô thí nghiệm, với liều tiêm giảm dần từ  $10^9$  (lô 1) đến  $10^4$  (lô 6), 1 lô đối chứng không tiêm; mỗi lô 6 con cá trọng lượng 120 g/con.

Kết quả thu được cho thấy ở lô 1 (tiêm 1 ml canh trùng nồng độ  $10^9$ ), sau 12h có 2 cá chết, 24h có thêm 2 cá chết, giờ 48 thêm 1 cá chết và tới giờ 72 chết con còn lại. Lô 1 sau 72h chết 100%. Lô 2 (nồng độ tiêm  $10^8$ ) sau 12h có 1 cá chết, 24h 2 cá chết, tiếp đó giờ 48, 72, 96 mỗi thời khắc có 1 cá chết. Lô 3 (nồng độ  $10^7$ ), giờ 24 có 1 cá chết, giờ 48 và 72 đều có 2 cá chết, giờ 96 có 1 cá chết. Lô 4 (nồng độ  $10^6$ ), giờ thứ 12 có 1 cá chết, giờ 48 có 1 cá chết, và giờ 72 và 96 mỗi thời khắc có 2 cá chết. Tới lô 5 (nồng độ  $10^5$ ) có 3 cá chết (1 chết với lúc 72h, 2

chết lúc 96h), và ở lô 6 (nồng độ  $10^4$ ) không có con cá nào chết. Đặc điểm chung của cá thử độc lực là có biểu hiện các triệu chứng, bệnh tích giống như dấu hiệu cá bị mắc bệnh ngoài tự nhiên. Sau 24h kể từ khi tiêm vi khuẩn, 100% số cá tiêm xuất hiện dấu hiệu bệnh lý. Ở lô 1, với lượng vi khuẩn  $10^9$  tế bào, cá chết đều có các vết xuất huyết to gần bằng đầu ngón tay. Các vết này đều ở bụng, gốc vây, và vùng tương ứng xoang bụng. Và sau 48h, phần lớn cá còn sống đều có hiện tượng xơ đuôi, khô vây. Mổ khám cá chết thấy nội quan đều bị tổn thương, gan, thận đều bị mủn.

Căn cứ vào kết quả thí nghiệm trên, có thể kết luận rằng: vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* là tác nhân gây bệnh đốm đỏ cho cá trắm cỏ.

Kết quả gây bệnh thực nghiệm được phản ánh qua bảng 1.

BẢNG 1. Kết quả gây bệnh thực nghiệm bằng một số chủng vi khuẩn phân lập trên cá trắm cỏ.

Lô TN	Chủng vi khuẩn	Số cá TN (con)	Trọng lượng cá TB (gam)	Lượng VK cảm nhiễm (TB/con)	Số cá chết trong thời gian theo dõi			Số cá chết/tổng số cá TN	Tỷ lệ chết (%)
					24h	48h	72h		
1	A2	6	120	$10^7$	2	1	1	4/6	66,67
2	A3	6	"	$10^7$	0	1	2	3/6	50,00
3	A6	6	"	$10^7$	0	0	2	2/6	33,33
4	A8	6	"	$10^7$	0	0	1	1/6	16,67
5	A11	6	"	$10^7$	0	1	2	3/6	50,00
Đ/C		6	"	-	0	0	0	0/6	0,00

Từ kết quả thử độc lực, chúng tôi đã tiến hành gây bệnh thực nghiệm cho cá ở nồng độ  $10^7$  vi khuẩn/cá.

Kết quả ghi ở bảng 1 cho thấy, tất cả các chủng vi khuẩn dùng gây bệnh thực nghiệm cho cá đều gây chết cá với thời gian từ 24-72 giờ, tỷ lệ cá chết giữa các lô thí nghiệm có sự khác nhau, biến đổi từ 16,67% đến 66,67%. Lô 1, dùng chủng vi khuẩn A2 gây bệnh, tỷ lệ cá chết nhiều nhất 66,67% (4/6) và thời gian cá bị chết cũng ngắn nhất (24 giờ). Lô 4, dùng chủng A8 gây bệnh, sau 72 giờ thí nghiệm có 1 cá bị chết, tỷ lệ thấp nhất 16,67% (1/6). Lô 2, dùng chủng A3 gây bệnh, tỷ lệ cá chết 50% (3/6). Lô 5 dùng chủng A11 gây bệnh, tỷ lệ cá chết cũng 50% (3/6). Lô 3 dùng chủng A6 gây bệnh, tỷ lệ cá chết 33,33% (2/6). Lô đối chứng, cả 6 cá theo dõi sau 72 giờ đều không biểu hiện triệu chứng của bệnh và không có cá bị chết. Sau 48h tất cả số cá gây bệnh cảm nhiễm (100%) đều có triệu chứng lâm sàng như cá mắc bệnh tự nhiên (xuất hiện các vết đỏ do xuất huyết, khô vây, xơ vây...). Như vậy là trong các chủng vi khuẩn chúng tôi phân lập, được chủng A2 là chủng có độc lực mạnh nhất và có khả năng gây chết cá nhiều hơn cả. Cùng với chủng A2, chủng A3, A11 cũng có độc lực cao có thể sử dụng các chủng vi khuẩn này để chế vaccine. Sau khi gây bệnh thực nghiệm, chúng tôi tiến hành thí nghiệm xác định liều gây chết 50% (LD50). Hai chủng A2 và A3 được chọn làm chủng thí nghiệm. Theo công thức của Reed L.J. và H.Muench (Reed 1938), chúng tôi đã tính được: Liều LD50 của chủng vi khuẩn A2 thời gian 96h là 106,8 và liều LD50 của chủng vi khuẩn A3 thời gian 96h là 107,9.

So sánh liên LD50 của 2 chủng vi khuẩn A2 và A3 mà chúng tôi đã xác định được trên cá trắm cỏ, tương đương với liều LD50 của tác giả Bùi Quang Tề (1998).

d) *Kết quả nghiên cứu khả năng miễn cảm với kháng sinh của vi khuẩn phân lập được*: Để đưa ra lời khuyên cáo phù hợp khi chữa bệnh cho cá mắc bệnh đốm đỏ, chúng tôi đã tiến hành xác định khả năng miễn cảm với một số loại kháng sinh của 74 chủng vi khuẩn phân lập được từ cá mắc bệnh đốm đỏ. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Kết quả cho thấy, Chloramphenicol có khả năng diệt vi khuẩn mạnh nhất, tiếp đến là Chlotetracycline, Neomycine. Các kháng sinh Furazolidon và Suphonamid có tác dụng diệt khuẩn kém hơn. Còn Peniciline, Ampiciline có khả năng diệt khuẩn rất kém. Qua kết quả ở bảng 2 cho thấy có thể sử dụng các loại kháng sinh theo thứ tự như Chloramphenicol, Chlotetracycline, Neomycine và Furazolidon để điều trị cho cá mắc bệnh đốm đỏ, không dùng Peniciline và Ampeciline để điều trị cho cá mắc bệnh.

e) *Kết quả xác định khả năng bảo hộ của Auto vaccin chế thử từ các chủng vi khuẩn phân lập được*: Để có biện pháp phòng bệnh chủ động, hữu hiệu chúng tôi đã thử nghiệm chế Autovaccin từ 2 chủng vi khuẩn A2 và A3. Autovaccin này là vaccin chết có bổ trợ keo phèn. Kết quả thí nghiệm Autovaccin trên cá cho thấy, cá được tiêm vaccin vào phúc mạc có tỷ lệ bảo hộ cao nhất, đạt 90%, tiếp đến là tiêm bắp 70% và thấp nhất là đưa vaccin bằng đường miệng, tỷ lệ 30%.

Ở lô đối chứng, cả 10 cá không được tiêm vaccin khi công cường độc vi khuẩn với liều 100 LD50 cho thấy cả 10 cá lô đối chứng đều chết.

**BẢNG 2. Khả năng miễn cảm với kháng sinh của vi khuẩn Aeromonas phân lập được.**

TT	Loại kháng sinh	Ký hiệu	Hàm lượng	Kết quả		
				Số chủng thử	Số chủng miễn cảm	Tỷ lệ %
1	Chloramphenicol	C	50µg	74	62	83,78
2	Chlotetracycline	CH	50µg	74	58	78,37
3	Furazolidon	FR	50µg	74	51	68,91
4	Neomycine	N	30µg	74	54	72,97
5	Streptomycine	S	25µg	74	45	60,81
6	Peniciline	P	5UI	74	29	39,18
7	Ampiciline	AMP	25µg	74	27	36,48
8	Sulphonamid	S3	300µg	74	49	66,21

### III. KẾT LUẬN

Phân lập được 74 chủng vi khuẩn Aeromonas từ tổng số 126 mẫu cá mắc bệnh chiếm tỷ lệ 58,7%. Các chủng vi khuẩn phân lập được từ cá mắc bệnh đốm đỏ có đầy đủ các đặc điểm hình thái nuôi cấy, sinh vật hoá học của vi khuẩn Aeromonas hydrophyla và khi gây bệnh cho cá, cá có bệnh tích điển hình của bệnh.

Kết quả thử kháng sinh đã xác định được

khả năng miễn cảm của vi khuẩn Aeromonas hydrophyla với Chloramphenicol là cao nhất (83,78%), tiếp đến là Chlotetracycline (78,37%) và thấp nhất với Ampiciline (36,48%).

Vaccin tự chế (Autovaccin) được chế từ chủng vi khuẩn A2 và A3 với liều 0,2ml vaccin tiêm phúc mạc cho cá mắc có cho tỷ lệ bảo hộ cao 90%, tiêm bắp cho tỷ lệ bảo hộ 70%, trong khi đó qua đường miệng, tỷ lệ bảo hộ thấp 30%.

### DETERMINATION OF DISEASE AGENT OF RED DISEASE IN CTENOPHARYNGODON IDELLUS, THE BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF ISOLATED STRAINS AND SELECTION OF STRAINS FOR VACCINE PRODUCTION

(Summary)

From 126 samples of diseased fish (Ctenopharyngodon idellus) raised in My Duc, Phu Xuyen (Hatay) and Thai Nguyen city were isolated 74 strains of Aeromonas hydrophyla or 58.7%. The isolated strains have all typical biochemical characteristics. With dose 0.2 bacterial culture (bacterin)/mouse, 12 selected strains kill white mice within 16 - 24 hours. Strains A2 and A3 were selected to cause experimental disease in fish, the mortality of fish is 50 - 100% after 96 hours with complete symptoms and pathological lesions of Red spot disease. The isolated strains were sensitive to antibiotics as: Chloramphenicol, Chlotetracycline and Neomycin. The vaccine made from isolated strains with dose 0,2ml can give 90% protection rate when used intraperitonium, 70% of protection when used intramuscularly and by oral route can give 30% protection.

## NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO KHÁNG HUYẾT THANH LEPTOSPIRA ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH LEPTOSPIROSIS CHO GIA SÚC

VŨ ĐÌNH HUNG, ĐOÀN KHẮC HỨC, NGUYỄN XUÂN QUÝ,  
NGUYỄN THẾ HÙNG, PHAN MINH

Ở thời kỳ đầu của bệnh Leptospirosis, gia súc sốt, mẫn bệnh có trong máu, điều trị bằng kháng sinh đặc hiệu đạt kết quả cao, song, biểu hiện sốt lại dễ nhầm với nhiều bệnh khác. Khi hết sốt, mẫn bệnh cư trú trong các ống thận nên điều trị bằng kháng sinh kết quả rất thấp. Để phòng bệnh này, biện pháp chủ yếu vẫn là dùng kháng huyết thanh, nhưng hiện nay, chúng ta chưa tự sản xuất được. Từ những năm 60 và 70 đã có nhiều tác giả nghiên cứu chế tạo kháng huyết thanh Leptospira đã giá nhưng chưa hoàn thiện. Chúng ta phải nhập kháng huyết thanh này từ Nga về sử dụng nên rất bị động mà giá mua lại cao. Vì vậy, nghiên cứu chế tạo KHT Leptospira để điều trị bệnh Leptospirosis là điều cần thiết.

### I. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

**Vật liệu:** Ngựa khỏe mạnh 250 - 300 kg/con. Thỏ 1,8 - 2kg. Chuột lang 180gam/con. Môi trường kiểm nghiệm và môi trường nuôi cấy Leptospira. Các serovar Leptospira dùng làm kháng nguyên. Một số hóa chất chuyên dùng và máy móc thiết bị của phòng thí nghiệm Leptospira.

**Phương pháp nghiên cứu:** Định chủng Leptospira bằng KHT chuẩn. Xác định hiệu giá kháng thể bằng phản ứng M.A.T, C.F.T và phản ứng trung hoà. Lấy máu ngựa ở tĩnh mạch cổ, chống đông bằng Citra Natri. Miễn dịch cơ sở và tối miễn

dịch cho ngựa bằng phương pháp tiêm kháng nguyên tăng dần đều. Kiểm nghiệm KHT theo phương pháp kiểm nghiệm các chế phẩm sinh học hiện hành của Trung tâm kiểm nghiệm thuốc thú y Quốc gia.

### II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

a) **Tổ chức sản xuất kháng nguyên:** Căn cứ vào kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả trong nước cho thấy, gia súc nuôi ở nước ta nhiễm các serovar Leptospira bataviae, canicola, mitis, pomona, icteroo - haemorrhagiae song chủ yếu là L.bataviae, L.mitis và L.pomona, nên chúng tôi đã sử dụng các chủng này vào việc sản xuất kháng nguyên. Các chủng này được sử dụng để tiêm cho chuột lang, mỗi chủng tiêm liều 2ml canh khuẩn/con. Kết quả theo dõi nhiệt độ chuột cho thấy, tất cả chuột sau khi được tiêm canh khuẩn của các chủng này đều sốt điển hình (trên lúc lên lúc xuống) 39,5°C song, chủng bataviae 2, mitis 2 và pomona 1 sốt điển hình hơn được chọn làm kháng nguyên. Bước tiếp theo là dùng 3 chủng này kiểm tra khả năng tạo kháng thể qua thí nghiệm tối miễn dịch cho thỏ. Kết quả thực hiện cho thấy, hiệu giá kháng thể của thỏ, tối miễn dịch bằng chủng L.bataviae cho miễn dịch cơ sở là 1/780, tối miễn dịch là 1/11.800; chủng L.mitis cho miễn dịch cơ sở là 1/735, tối miễn dịch là 1/10.720; chủng L.pomona cho miễn dịch cơ sở là 1/860, tối miễn dịch là 1/11.300.