

PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN *Riemerella anatipestifer* TỪ THỦY CẦM NGHI MẮC BỆNH NHIỄM TRÙNG HUYẾT TẠI TỈNH HÀ NAM

Trương Quang Lâm*, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Thị Thu Hương, Đào Lê Anh, Trần Danh Sơn

Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ sinh học Thú y,
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam,

*Tác giả liên hệ: tqlam@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 01.06.2021

Ngày chấp nhận đăng: 10.01.2022

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập, giám định và định danh bằng phương pháp PCR và MALDI-TOF MS đối với các chủng vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* phân lập được từ vịt, ngan tại một số trang trại thuộc tỉnh Hà Nam. Tổng số 45 mẫu vịt nghi mắc bệnh được thu thập từ một số trang trại ở huyện Lý Nhân, Bình Lục, Duy Tiên với mẫu bệnh phẩm gồm: não, tim, gan, phổi, lách. 27 mẫu trong tổng số 45 mẫu vịt xét nghiệm cho thấy có các khuẩn lạc nghi ngờ với các đặc điểm như sau: kích thước nhỏ, trong, không dung huyết với đặc tính sinh hóa chính như catalase, oxidase dương tính, indol âm tính, không mọc trên thạch Macconkey. Kết quả định danh nhanh các chủng RA bằng phương pháp MALDI TOF MS sử dụng công nghệ khối phổ protein cho thấy 27/45 (60%) mẫu dương tính với vi khuẩn RA. Kết quả này tương đồng 100% với kết quả giám định bằng phương pháp PCR.

Từ khóa: MALDI TOF MS, PCR, phân lập, *Riemerella anatipestifer*, thủy cầm.

Isolation and Rapid Identification by MALDI-TOF MS of *Riemerella anatipestifer* from Clinical Cases in Waterfowls in Ha Nam Province

ABSTRACT

This study aimed to isolate and identify by PCR and MALDI-TOF MS of *Riemerella anatipestifer* (RA) strains isolated from ducks and muscovy ducks in Ha Nam province. Samples including brain, heart, liver, lung, and spleen were collected from 45 suspected ducks in the farms in Ly Nhan, Binh Luc, Duy Tien districts. Total 27 out of 45 ducks showed the appearance of suspected colonies with the following characteristics: small, transparent, non-hemolysis with the main biochemical features as negative for indole, positive for catalase and oxidase test, and did not grow on MacConkey agar plates. Rapid identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI TOF MS) showed that 27 suspected colonies were positive to RA. This result is 100% in agreement with the PCR results.

Keywords: Isolation, MALDI TOF MS, PCR, *Riemerella anatipestifer*, waterfowls.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Riemerella anatipestifer (RA) là tác nhân gây bệnh truyền nhiễm ở vịt và các loài thủy cầm khác gây thiệt hại kinh tế lớn. Bệnh được biết nhiều với tên gọi là nhiễm trùng huyết ở vịt, hội chứng anatipestifer, nhiễm trùng huyết và viêm thanh mạc truyền nhiễm (Soman & cs., 2014). Năm 1932, nhiễm trùng RA lần đầu tiên được mô tả ở Long Island (New York) trên vịt Pekin, sau

đó được gọi là bệnh vịt mới (new duck disease) (Leibovitz, 1972). Trong một thời gian dài, RA có nhiều tên gọi khác nhau: *Pfeifferella anatipestifer*, *Moraxella anatipestifer*, *Pasteurella anatipestifer*, và cuối cùng vi khuẩn được đặt tên là *Riemerella anatipestifer* vào năm 1993 (Sandhu, 2008). Là một thành viên thuộc họ *Flavobacteriaceae*, RA bắt màu gram âm, hình que, gây, không di động, không sinh nha bào thường thấy ở dạng đơn lẻ, theo cặp và đôi

khi ở dạng chuỗi (Li & cs., 2017). Tỷ lệ tử vong có thể lên tới 75%, đặc biệt ở giai đoạn vịt con (Sandhu, 2008). Nhiễm trùng xảy ra ở ba thể: quá cấp tính, cấp tính hoặc mãn tính (Li & cs., 2011). Dấu hiệu lâm sàng bao gồm ủ rũ, chảy nước mắt, tiêu chảy phân xanh, đi lại khó khăn, ngã ngửa tư thế bơi chèo và run rẩy. Viêm màng fibrin ở ngoại tâm mạc, màng ngoài gan, túi khí; viêm não và viêm màng não được xem là các bệnh lý đặc trưng của bệnh này (Chikuba & cs., 2016). Hiện tại, trên thế giới đã xác định được 21 kiểu serotype và không có báo cáo nào cho thấy có bảo hộ chéo nhau giữa các kiểu huyết thanh (Wang & cs., 2012b).

Hiện nay, ứng dụng công nghệ mới trong phân lập, giải trình tự và giám định và định danh vi khuẩn gây bệnh trên vật nuôi ngày càng phổ biến trên thế giới, trong đó sử dụng phương pháp phân tích phân tử ion hóa nhờ matrix, lazer, thời gian bay và dựa trên khối phổ protein (phương pháp MALDI-TOF MS) được coi là phương pháp có độ tin cậy cao trong xác định vi khuẩn RA khi so sánh với các chủng tham chiếu (Hess & cs., 2013; Tzora & cs., 2021). Vi khuẩn RA đã được phân lập và xác định thành công với phương pháp MALDI-TOF MS từ các ca lâm sàng trên chim bồ câu, ngỗng và gà (Hess & cs., 2013; Rubbenstroth & cs., 2011; Tzora & cs., 2021). Phương pháp MALDI-TOF MS cần cán bộ nghiên cứu có kinh nghiệm, thời gian phân tích nhanh và hiệu quả về chi phí vận hành và nguyên liệu để sử dụng trong phòng thí nghiệm.

Bệnh nhiễm trùng huyết do vi khuẩn RA mặc dù được coi là bệnh truyền nhiễm quan trọng trên thủy cầm gây thiệt hại lớn ở nhiều tỉnh thành tại Việt Nam trong nhiều năm, trong đó có tỉnh Hà Nam, tuy nhiên các nghiên cứu liên quan đến vi khuẩn RA vẫn còn hạn chế. Gần đây, một số công trình nghiên cứu phân lập vi khuẩn RA và xác định tỉ lệ nhiễm cao trên vịt tại các tỉnh Bến Tre, Long An, Bình Định, Thanh Hóa, Thái Bình đã được công bố bởi Lý Thị Liên Khai & cs. (2018); Võ Thành Thìn & cs. (2020). Xuất phát từ tình hình dịch bệnh phức tạp xảy ra trên thủy cầm tại địa bàn tỉnh Hà Nam, nhóm nghiên cứu đã tiến hành nghiên cứu phân lập và xác định tỉ lệ nhiễm bệnh

nhiễm trùng huyết trên vịt do vi khuẩn RA tại các trang trại thủy cầm tại 3 huyện Lý Nhân, Bình Lục, Duy Tiên tỉnh Hà Nam. Ngoài ra, đây cũng là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam ứng dụng công nghệ, phương pháp MALDI-TOF MS để định danh nhanh các chủng phân lập, và so sánh với phương pháp giám định vi khuẩn bằng phản ứng PCR.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu phân lập vi khuẩn RA từ thủy cầm nghi mắc bệnh nhiễm trùng huyết tại một số huyện trên địa bàn tỉnh Hà Nam.

- Nghiên cứu định danh các chủng vi khuẩn RA phân lập được bằng phương pháp PCR và MALDI TOF MS.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Các môi trường, hóa chất được chúng tôi sử dụng cho quá trình nuôi cấy RA gồm: Thạch blood agar base (BD); Brain heart infusion broth - BHI (Merck); Horse serum (HS, Gibco); Yeast extract (Merck, Germany); thạch MacConkey (BD); Catalase (Hydrogen peroxide 3%, Merck); Oxidase (1% *N, N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine hydrochloride, Sigma); Kovac's/Indole (Merck); Urease base (BD); Bộ kit nhuộm Gram (Merck); Kit chiết tách DNA (QIAGEN), GoTaq PCR green (Promega), axit α -cyano-4-hydroxycinnamic (Bruker Daltonic GmbH).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thu thập mẫu bệnh phẩm

Chúng tôi tiến hành thu thập mẫu bệnh phẩm của vịt, ngan có các triệu chứng điển hình bệnh nhiễm trùng huyết trên vịt tại các trang trại thủy cầm tại địa bàn một số huyện Lý Nhân, Bình Lục, Duy Tiên thuộc tỉnh Hà Nam trong khoảng thời gian từ năm 2020 đến đầu năm 2021. Vịt, ngan nghi mắc bệnh được mổ khám, thu thập các mẫu bệnh phẩm bao gồm: não, tim, gan, phổi, lách được bảo quản ở điều kiện lạnh 4-6°C và chuyển ngay (trong 6-10h) đến Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ sinh học Thú y, Khoa Thú y, Học viện Nông

ngiệp Việt Nam để tiến hành nghiên cứu phân lập vi khuẩn RA.

2.3.2. Phân lập vi khuẩn

Mẫu bệnh phẩm bao gồm não, tim, gan, phổi, lách được ria cấy trên môi trường thạch máu sử dụng 7% máu thỏ, ủ ở điều kiện 37°C với 5% CO₂, và theo dõi khuẩn lạc mọc trong 24-48 giờ. Các khuẩn lạc được tiến hành nhuộm Gram, xác định hình thái học, đặc tính nuôi cấy và sinh hóa (phản ứng oxidase, catalase, indol, sinh ure, sinh H₂S, khả năng mọc trên MacConkey). Các chủng phân lập được kiểm tra khả năng dung huyết trên thạch máu và xác định kiểu hình khuẩn lạc (khả năng phát triển, hình thái).

2.3.3. Định danh vi khuẩn RA bằng phương pháp MALDI TOF MS

Việc xác định các chủng phân lập RA được tiến hành bằng phương pháp MALDI TOF MS (Bruker Daltonic, Bremen, Đức) sử dụng công nghệ khối phổ protein như đã được mô tả trước đây (Hess & cs., 2013; Tzora & cs., 2021). Các protein của vi khuẩn được chiết xuất bằng cách

sử dụng axit formic và acetonitril, và dung dịch matrix (axit α -cyano-4-hydroxycinnamic) theo quy trình tiêu chuẩn từ Bruker Daltonic dựa trên 240 bức ảnh laser trong 40 bước bắn và mỗi điểm được đo tự động hai lần sử dụng phần mềm Flex control 4.1 (Bruker Daltonic). Thư viện các chủng tham chiếu online dựa trên protein banks và Bruker Daltonic để xác định các chủng phân lập. Phương pháp được hiệu chuẩn bằng dung dịch kiểm tra chuẩn (Bacterial Test Standard) có chứa các peptides và dữ liệu protein khác điển hình của vi khuẩn *E. coli* DH5 α (Bruker, Daltonic, Bremen, Đức). Các khối phổ lượng của các chủng phân lập tại thực địa được biểu hiện dưới dạng biểu đồ với 70 điểm khối phổ mặc định phân tích bởi phương pháp MALDI TOF MS, và được so sánh bằng phần mềm Maldi Biotyper 4.1 (Bruker Daltonic, Bremen, Đức) với các chủng chuẩn RA tham chiếu là *Riemerella anatipestifer* DSM 15868T; *Riemerella anatipestifer* GD47 GDD trong ngân hàng dữ liệu. Điểm log từ 1,7 đến 2,0 thể hiện xác định mức độ chi; điểm log \geq 2,0 thể hiện xác định mức độ loài; kết quả dưới 1,7 thể hiện không thể xác định được vi khuẩn.



Ghi chú: A: Ngan 4 tháng tuổi chết tư thế ngã ngửa; B: Tiêu chảy phân xanh - trắng ở ngan; C: Triệu chứng thần kinh: đầu quét đất, chạy vòng tròn; D: Viêm màng phủ fibrin tim, gan vịt; E: Vịt viêm màng fibrin túi khí, có tổ chức dạng cục màu vàng; F: Sung huyết, xuất huyết não trên vịt.

Hình 1. Dấu hiệu lâm sàng của vịt, ngan mắc bệnh nhiễm trùng huyết

2.3.4. Giám định vi khuẩn RA bằng phương pháp PCR

DNA của vi khuẩn được chiết tách sử dụng Kit chiết tách DNA thương mại QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Mỹ). Quy trình chiết tách DNA được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng PCR dùng để giám định các chủng phân lập sử dụng cặp mồi đặc hiệu (669AF: 5'-TTACCGACTGATTGCCTTCTAG-3'; 669AR: 5'-AGAGGAAGACCGAGGACATC-3') khuếch đại đoạn gen ribonuclease Z của vi khuẩn RA (Kardos & cs., 2007). Đối chứng dương là DNA của vi khuẩn RA (VNUA-RA01) được phân lập đầu năm 2019, được giám định đặc tính sinh hóa, phương pháp PCR và phân tích giải trình tự cho kết quả chính xác là vi khuẩn RA (Được sử dụng làm chủng chuẩn xây dựng tiêu chuẩn cơ sở ISO 170025). Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 5,5µl nuclease-free water; 12,5µl master mix; 1µl reverse primer; 1µl forward primer; 5µl khuôn mẫu DNA. Chu trình nhiệt được thực hiện gồm 3 bước bao gồm: Tiền biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút; Chu kỳ lặp lại 35 lần: Biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 55°C trong 1 phút, tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 1 phút; hoàn thành ở 72°C trong 6 phút. Điện di thạch và đọc kết quả: Sản phẩm PCR được điện di trên gel 1% (TBE 1X) với thang DNA chuẩn 100bp (Invitrogen). Sử dụng nguồn điện di ở hiệu điện thế 100V cường độ 100mA, thời gian chạy điện di trong 30 phút. Sản phẩm PCR cho sản phẩm có độ dài 546bp.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Triệu chứng, bệnh tích sau mổ khám

Các mẫu bệnh phẩm bao gồm: não, tim, phổi, gan, lách được thu thập từ vệt, gan có triệu chứng lâm sàng nghi mắc bệnh nhiễm trùng huyết như sốt, run rẩy, đi loạng choạng, ngã ngựa mất kiểm soát, đầu vẹo một bên và thực hiện động tác quay tròn (Hình 1C); chảy nước mắt và nước mũi, tiêu chảy phân xanh màu như lá trầu hoặc xanh trắng (Hình 1B), có thể ho nhẹ. Triệu chứng tiêu chảy phân xanh, viêm khớp gối, con vật đi lại khó khăn, nằm yên

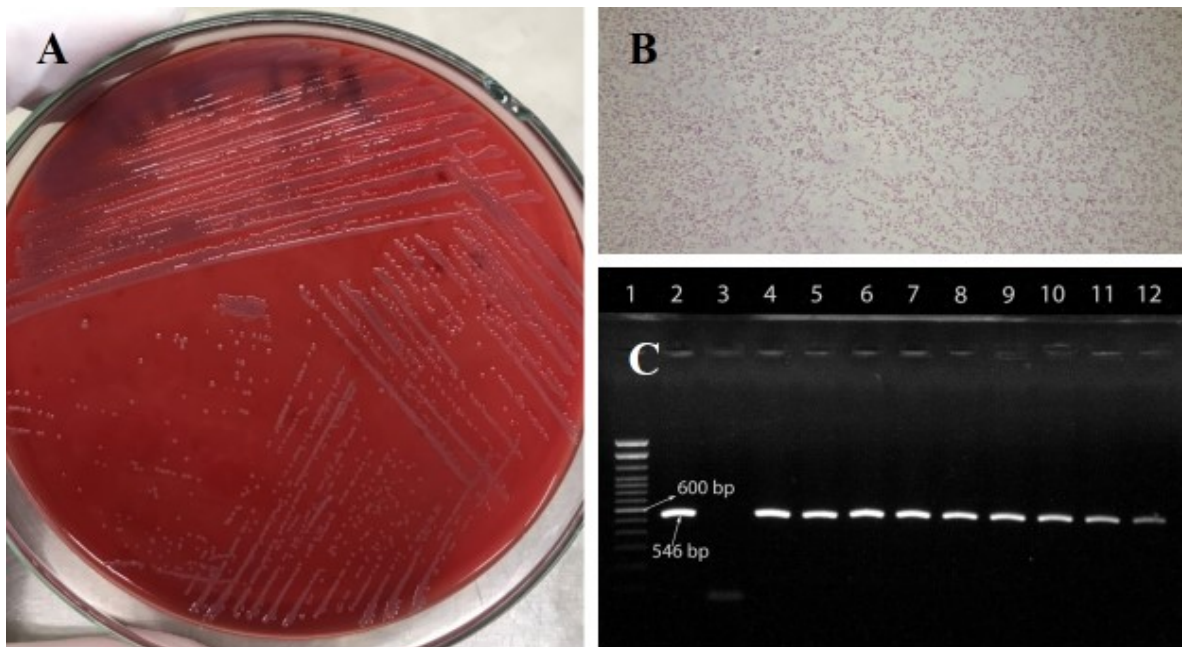
một chỗ cũng được quan sát thấy, phù hợp với mô tả trong các nghiên cứu trước đây (Priya & cs., 2008; Sandhu, 2008; Sarker & cs., 2017). Bệnh tích đại thể sau mổ khám thường thấy đó là viêm thanh mạc; viêm fibrin túi khí, trên bề mặt gan và xoang bao tim (Hình 1D và E). Các túi khí bị viêm nặng nhất, với đặc trưng tạo thành các tổ chức dạng cục màu vàng (Hình 1E). Lách sưng to, có thể có các đốm trắng; gan sưng to, nhũn như bùn; túi mật viêm, tăng sinh tăng tiết dịch mật. Viêm màng não, xuất huyết não cũng được quan sát thấy (Hình 1F). Bệnh tích đại thể như viêm và phủ fibrin màng ngoài gan, màng ngoài tim và túi khí cùng với các tổn thương bệnh lý đặc trưng giống với các mô tả trước đây (Chikuba & cs., 2016; Leavitt & Ayroud, 1997; Sandhu, 2008).

3.2. Kết quả phân lập vi khuẩn RA từ vệt nghi mắc bệnh nhiễm trùng huyết

Từ 45 mẫu vệt nghi mắc bệnh với mẫu bệnh phẩm bao gồm: tim, gan, lách, phổi, não được sử dụng để phân lập vi khuẩn trên môi trường thạch máu. Theo Pathanasophon & cs. (1995), RA có thể dễ dàng được phân lập từ máu tim, gan, lá lách, phổi và não trong giai đoạn cấp tính của bệnh. Gooderham (1996) thì cho rằng mẫu bệnh phẩm não là nguồn tốt nhất để phân lập vi khuẩn RA. Trong nghiên cứu này, 27 khuẩn lạc điển hình nghi vi khuẩn RA (60%) đã được phân lập từ 45 vệt, gan nghi mắc bệnh trên môi trường thạch máu (Bảng 1). Các chủng vi khuẩn trên thạch máu có hình thái khuẩn lạc tròn, lồi, trong suốt, không dung huyết, hơi nhầy, đường kính 1mm sau 24 giờ (Hình 2A). Sau 48 giờ, khuẩn lạc tăng kích thước, màu sắc chuyển dần sang màu xám, keo dính. Vi khuẩn bắt màu gram âm, không di động, có hình thái đa dạng từ dạng trực khuẩn hình que ngắn đến dạng sợi (Hình 2B) (Surya & cs., 2016). Các chủng nghi ngờ vi khuẩn RA đều dương tính với phản ứng oxidase và catalase, âm tính với indol, H₂S và không mọc trên môi trường MacConkey. Đáng chú ý, 18/27 (66,67%) chủng vi khuẩn cho kết quả dương tính với phản ứng urease, 9/27 chủng vi khuẩn cho kết quả urease âm tính chỉ

ra sự đa dạng của loài. Các biến chủng được quan sát thấy khi có sự đa dạng đối với phản ứng urease và lên men đường (Pillai & cs., 1993; Shome & cs., 2004). Kết quả đặc tính sinh học và sinh hóa của các chủng phân lập tương đồng với các kết quả nghiên cứu trước đây (Rubbenstroth & cs., 2011; Soman & cs., 2014). Tất cả 27 chủng vi khuẩn RA đồng thời được giám định bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu gene ribonuclease Z theo nghiên cứu của Kardos & cs., (2007). Kết quả giám định bằng phương pháp PCR cho thấy cả 27 chủng vi khuẩn đều dương tính PCR với DNA của vi khuẩn RA cho độ dài sản phẩm 546 bp, đạt tỉ lệ 100% (Bảng 1).

Những kết quả cho thấy tỉ lệ phân lập và nhiễm đạt ở mức cao chiếm 60% (27/45, Bảng 1), cao hơn so với các nghiên cứu trước đây của Võ Thành Thìn & cs. (2020), Lý Thị Liên Khai & cs. (2018). Trong nghiên cứu của Võ Thành Thìn & cs. (2020) cho thấy tỉ lệ nhiễm vi khuẩn RA từ các vịt nghi mắc bệnh tại các tỉnh Thái Bình là 41,66%; Thanh Hóa là 39,58%; Long An là 33,33%; Bình Định là 26,04%. Trong nghiên cứu của Lý Thị Liên Khai & cs. (2018) cho thấy tỉ lệ vịt nhiễm bệnh là 50,7% tại tỉnh Bến Tre. Tỉ lệ nhiễm bệnh cao trong nghiên cứu này tương đồng với các công trình nghiên cứu trước đây tại Đan Mạch, Ấn Độ và Trung Quốc với tỉ lệ nhiễm dao động từ 50-80% (Priya & cs., 2008; Ryll & cs., 2001; Wang & cs., 2012a).



Ghi chú: Giếng 1: Marker 1.2 kb, Giếng 2: “+” (Đối chứng dương, VNUA-RA01), Giếng 3: “-” (Đối chứng âm), Giếng 4 đến giếng 12: là sản phẩm PCR của 9 mẫu khuẩn lạc nghi vi khuẩn RA phân lập được.

Hình 2. Vi khuẩn RA (A) mọc trên môi trường thạch máu sau 24 giờ nuôi cấy; (B) hình thái nhuộm Gram và (C) kết quả giám định vi khuẩn RA bằng phản ứng PCR

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn RA từ vịt và ngan nghi mắc bệnh

| Địa điểm | Số con xét nghiệm | Phân lập | | PCR | |
|----------|-------------------|------------|-----------|------------|-----------|
| | | Dương tính | Tỉ lệ (%) | Dương tính | Tỉ lệ (%) |
| Lý Nhân | 20 | 11 | 55 | 11 | 55 |
| Bình Lục | 13 | 10 | 76,92 | 10 | 76,92 |
| Duy Tiên | 12 | 6 | 50 | 6 | 50 |
| Tổng | 45 | 27 | 60 | 27 | 60 |

3.3. Định danh nhanh vi khuẩn RA bằng phương pháp MALDI TOF MS

Ứng dụng phương pháp MALDI-TOF MS trong việc giám định và định danh các chủng vi khuẩn RA đã được chứng minh thành công và hiệu quả trong chẩn đoán, phân lập đối với các ca lâm sàng ở chim bồ câu, ngỗng như đã mô tả trước đây (Hess & cs., 2013; Rubbenstroth & cs., 2011; Rubbenstroth & cs., 2013). Trong nghiên cứu này, 27 chủng vi khuẩn sau khi phân lập được sử dụng để giám định và định danh bằng phương pháp MALDI TOF MS. Kết quả trình bày tại Bảng 2 cho thấy cả 27 chủng vi khuẩn được định danh là vi khuẩn RA với các điểm log của dao động từ 2,080-2,360 cho thấy độ chính xác ở mức độ loài các nhất (Hess & cs., 2013; Tzora & cs., 2021).

Tất cả 27 chủng vi khuẩn RA đã được định danh bởi phương pháp MALDI TOF MS đều cho kết quả tương đồng 100% với phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu gene ribonuclease Z (Hình 2C; Bảng 2). Với kết quả này, có thể thấy việc sử dụng phương pháp MALDI TOF MS có nhiều lợi thế: giá thành xét nghiệm rẻ, độ đặc hiệu cao, cho phép xác định nhanh, chính xác nguyên nhân gây bệnh trong vòng 24 giờ, để từ đó kịp thời đưa ra các giải pháp và phác đồ điều trị bệnh hiệu quả. Qua nghiên cứu này cho thấy, phương pháp MALDI TOF MS cho kết quả định danh vi khuẩn ngắn hơn (30 giây/1 mẫu vi khuẩn) và rẻ hơn so với phương pháp PCR truyền thống được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu trong nước và trên thế giới. Định dạng protein bằng phương pháp khối phổ đã được chứng minh là một phương pháp nhanh chóng và đáng tin cậy để xác định các chủng đối chứng RA (Rubbenstroth & cs., 2011).

Theo kết quả nghiên cứu của Sauer & cs., (2008) và Tzora & cs., (2021) đã chỉ ra rằng khi phân tích và so sánh khối phổ protein của các chủng phân lập có mức khoảng cách (distance level) dưới 500 (< 500) cho kết quả tin cậy, với khả năng phân loại các chủng theo loài hoặc dưới loài (Sauer & cs., 2008; Tzora & cs., 2021). Trong khi đó, các chủng trong nhóm có mức

khoảng cách (distance level) trên 500 (> 500) chỉ ra sự tồn tại của các chủng khác biệt (Sauer & cs., 2008; Tzora & cs., 2021), có thể liên quan đến sự đa dạng của các tuýp huyết thanh (serotypes) của vi khuẩn RA gây bệnh trên vịt, ngan. Phân tích biểu đồ MSP Dendrogram (Hình 3) thể hiện mối liên hệ giữa các chủng phân lập tại tỉnh Hà Nam cho thấy sự đa dạng giữa các chủng phân lập RA tại tỉnh Hà Nam với 5 nhánh chính: cluster 1, 2, 3, 4, 5 (Hình 3). Các chủng RA3, RA17, RA18, RA27 nằm trong cluster 1, trong đó chủng RA3 và RA27 có mối quan hệ mật thiết với nhau. Đáng chú ý, duy nhất chủng RA11 thuộc cluster 2 riêng biệt với mức độ khoảng cách > 800. Các chủng RA6, RA21, RA22 thuộc cluster 3 cùng nhánh phát sinh với chủng tham chiếu *Riemerella anatipestifer* DSM 15868T DSM, và có mối quan hệ mật thiết với mức độ khoảng cách < 500. Các chủng RA8 và RA13 nằm trong cùng nhánh phát sinh thuộc cluster 4. Đáng chú ý, đa số các chủng phân lập còn lại bao gồm RA1, RA2, RA4, RA5, RA7, RA9, RA10, RA12, RA14, RA15, RA16, RA19, RA20, RA23, RA24, RA25 và RA26 tạo thành một nhánh riêng biệt thuộc cluster 5 (< 500) với 2 nhánh nhỏ 5.1 và 5.2. Các chủng trong những nhánh này cho thấy có mối quan hệ gần gũi với nhau với mức khoảng cách < 100-200. Đây là nghiên cứu đầu tiên sử dụng phương pháp MALDI TOF MS ở Việt Nam để định danh nhanh các chủng vi khuẩn RA gây bệnh trên vịt và ngan tại các trang trại ở 3 huyện Lý Nhân, Bình Lục, Duy Tiên thuộc tỉnh Hà Nam. Việc sử dụng MALDI Biotyper cho kết quả tin cậy cao đối với việc xác định và đánh giá mối liên hệ giữa các chủng vi khuẩn RA, sử dụng các chủng tham chiếu RA theo các mô tả trong các nghiên cứu trước đây trên thế giới (Hess & cs., 2013; Rubbenstroth & cs., 2011; Rubbenstroth & cs., 2013), đồng thời đơn giản và hiệu quả về chi phí để sử dụng trong phòng thí nghiệm (Hess & cs., 2013). Thông qua nghiên cứu này cho thấy cần thiết trong việc sử dụng phương pháp MALDI TOF MS phục vụ công tác chuẩn đoán nhanh dịch bệnh trên động vật. Các nghiên cứu tiếp theo là rất cần thiết

nhằm đánh giá tính miễn dịch kháng sinh các chủng phân lập, xác định các typ huyết thanh phổ biến gây bệnh, xác định độc lực, giải trình tự genome và phát triển các vacxin, chế phẩm phục vụ công tác phòng và điều trị bệnh góp phần nâng cao năng suất ngành chăn nuôi thủy cầm tại địa bàn tỉnh Hà Nam nói riêng và các tỉnh thành tại Việt Nam nói chung.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 27 chủng vi khuẩn từ các vịt, ngan nghi mắc bệnh nhiễm trùng huyết do vi khuẩn RA gây ra.

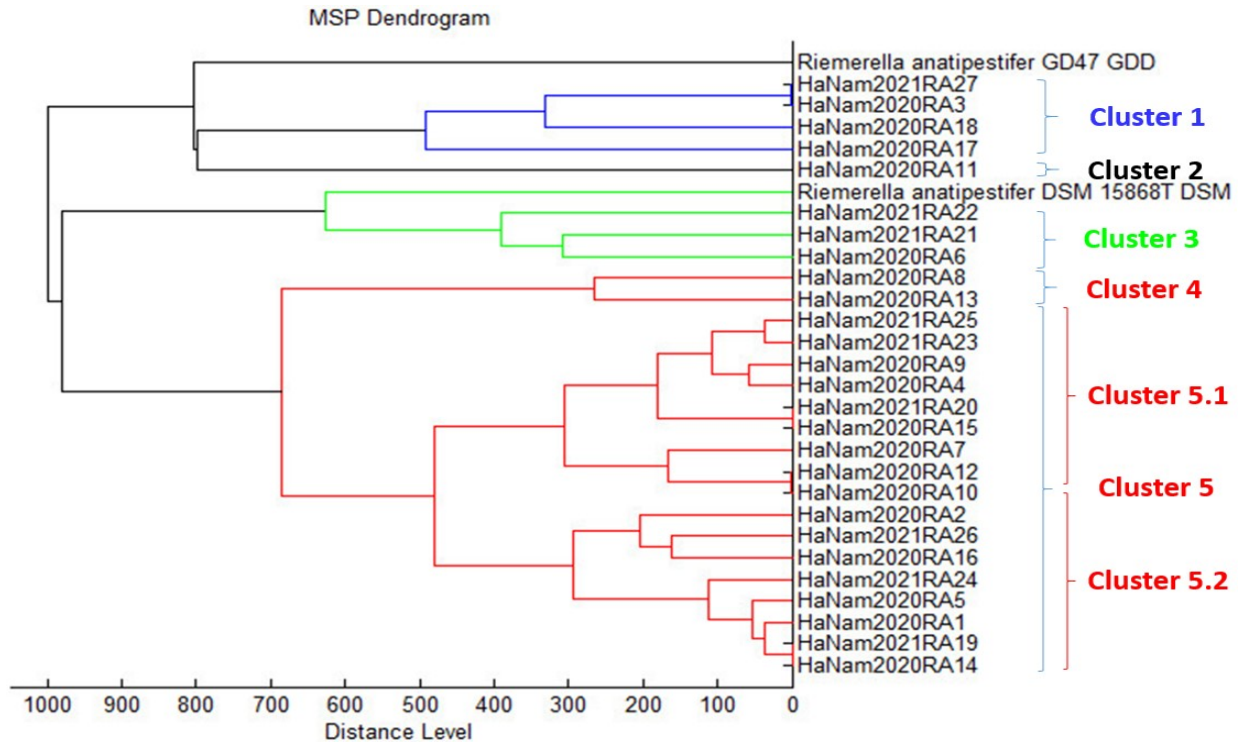
Tỉ lệ phân lập vi khuẩn RA gây bệnh nhiễm trùng huyết đạt ở mức cao, chiếm tỉ lệ 60% (27/45) tổng số mẫu tại địa bàn nghiên cứu.

Nghiên cứu đã sử dụng thành công phương pháp MALDI TOF MS trong chẩn đoán và định danh nhanh, chính xác 27/27 chủng vi khuẩn RA, cho kết quả tương đồng 100% với phương pháp PCR truyền thống.

Giám định và định danh bằng phương pháp MALDI TOF MS cần được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán và nghiên cứu dịch bệnh với nhiều ưu thế: nhanh, đặc hiệu, chính xác, giá thành rẻ.

Bảng 2. Kết quả định danh vi khuẩn RA bằng phương pháp MALDI TOF MS

| Chủng thực địa | Kết quả PCR | Chủng tham chiếu | Điểm log |
|-----------------|-------------|---|----------|
| HaNam/2020/RA1 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,180 |
| HaNam/2020/RA2 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,280 |
| HaNam/2020/RA3 | Dương tính | Riemerella anatipestifer DSM 15868T DSM | 2,330 |
| HaNam/2020/RA4 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,280 |
| HaNam/2020/RA5 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,260 |
| HaNam/2020/RA6 | Dương tính | Riemerella anatipestifer DSM 15868T DSM | 2,110 |
| HaNam/2020/RA7 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,270 |
| HaNam/2019/RA8 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,080 |
| HaNam/2020/RA9 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,230 |
| HaNam/2020/RA10 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,250 |
| HaNam/2020/RA11 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,210 |
| HaNam/2020/RA12 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,250 |
| HaNam/2020/RA13 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,160 |
| HaNam/2020/RA14 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,220 |
| HaNam/2020/RA15 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,340 |
| HaNam/2020/RA16 | Dương tính | Riemerella anatipestifer DSM 15868T DSM | 2,270 |
| HaNam/2020/RA17 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,300 |
| HaNam/2020/RA18 | Dương tính | Riemerella anatipestifer DSM 15868T DSM | 2,350 |
| HaNam/2021/RA19 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,350 |
| HaNam/2021/RA20 | Dương tính | Riemerella anatipestifer DSM 15868T DSM | 2,240 |
| HaNam/2021/RA21 | Dương tính | Riemerella anatipestifer DSM 15868T DSM | 2,100 |
| HaNam/2021/RA22 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,210 |
| HaNam/2021/RA23 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,160 |
| HaNam/2021/RA24 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,260 |
| HaNam/2021/RA25 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,170 |
| HaNam/2021/RA26 | Dương tính | Riemerella anatipestifer GD47 GDD | 2,250 |
| HaNam/2021/RA27 | Dương tính | Riemerella anatipestifer DSM 15868T DSM | 2,360 |



Hình 3. Biểu đồ mối quan hệ giữa các chủng RA tại Hà Nam với các chủng tham chiếu

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu cấp Học viện, và sự hỗ trợ của của các cán bộ tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ sinh học Thú y và nhóm sinh viên nghiên cứu khoa học (Trần Danh Sơn, Lê Thị Trang, Vũ Thị Ánh, Nguyễn Thị Thu Huyền). Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chikuba T., Uehara H., Fumikura S., Takahashi K., Suzuki Y., Hoshino K. & Yamamoto Y. (2016). *Riemerella anatipestifer* infection in domestic ducks in Japan, 2014. *Journal of Veterinary Medical Science*. 78(10):1635-1638.
- Gooderham K. (1996). *Anatipestifer* infection. Jordan, F. TW and Pattinson, M.(eds.). *Poultry Diseases*. p. 234.
- Hess C., Enichlmayr H., Jandreski-Cvetkovic D., Liebhart D., Bilic I. & Hess M. (2013). *Riemerella anatipestifer* outbreaks in commercial goose flocks and identification of isolates by MALDI-TOF mass spectrometry. *Avian Pathology*. 42: 151-156.
- Kardos G., Nagy J., Antal M., Bistyak A., Tenk M. & Kiss I. (2007). Development of a novel PCR assay specific for *Riemerella anatipestifer*. *Lett Appl Microbiol*. 44: 145-148.
- Leavitt S. & Ayroud M. (1997). *Riemerella anatipestifer* infection of domestic ducklings. *The Canadian Veterinary Journal*. 38: 113.
- Leibovitz L. (1972). A survey of the so-called "anatipestifer syndrome". *Avian diseases*. pp. 836-851.
- Li J., Tang Y., Gao J., Huang C. & Ding M. (2011). *Riemerella anatipestifer* infection in chickens. *Pak Vet J*. 31: 65-69.
- Li T., Shan M., He J., Wang X., Wang S., Tian M., Qi J., Luo T., Shi Y. & Ding C. (2017). *Riemerella anatipestifer* M949_0459 gene is responsible for the bacterial resistance to tigecycline. *Oncotarget*. 8: 96615
- Lý Thị Liên Khai & Nguyễn Hiền Hậu (2018). Bệnh bại huyết trên vịt do *Riemerella anatipestifer* gây ra tại tỉnh Bến Tre. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*. 54(Sô chuyên đề: Nông nghiệp): 90-97.
- Pathanasophon P., Sawada T. & Tanticharoenyos T. (1995). New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. *Avian Pathology*. 24. 195-199.
- Pickrell J.A. (1966). Pathologic changes associated with experimental *Pasteurella anatipestifer* infection in ducklings. *Avian diseases*. 10: 281-288.

- Pillai R., James P., Punnose K., Sulochana S., Jayaprakasan V. & Nair G. (1993). Outbreak of Pasteurellosis among duck population in Kerala. *J. Vet. Anim. Sci.* 24: 34-39.
- Priya P., Pillai D. S., Balusamy C., Rameshkumar P. & Senthamselvan P. (2008). Studies on outbreak of new duck disease in Kerala, India. *Int. J. Poult. Sci.* 7: 189-190.
- Rubbenstroth D., Hotzel H., Knobloch J., Teske L., Rautenschlein S. & Ryll M. (2011). Isolation and characterization of atypical *Riemerella columbina* strains from pigeons and their differentiation from *Riemerella anatipestifer*. *Veterinary microbiology.* 147: 103-112.
- Rubbenstroth D., Ryll M., Knobloch J. K.-M., Köhler B. & Rautenschlein S. (2013). Evaluation of different diagnostic tools for the detection and identification of *Riemerella anatipestifer*. *Avian Pathology.* 42: 17-26.
- Ryll M., Christensen H., Bisgaard M., Christensen J. P., Hinz K. H. & Köhler B. (2001). Studies on the prevalence of *Riemerella* in the upper respiratory tract of clinically healthy ducklings and characterization of untypable strains. *Journal of Veterinary Medicine, Series B.* 48: 537-546.
- Sandhu T.S. (2008). *Riemerella anatipestifer* infection. *Diseases of poultry.* pp. 758-764.
- Sarker R., Rahman M., Haque M., Rima U. & Hossain, M. (2017). Identification of Ribonuclease Z Gene from an Outbreak of *Riemerella anatipestifer* Infection in Ducks of Bangladesh. *Poult Fish Wildl Sci.* 5: 2.
- Sauer S., Freiwald A., Maier T., Kube M., Reinhardt R., Kostrzewa M. & Geider K. (2008). Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One.* 3: e2843.
- Shome R., Shome B., Rahman H., Murugkar H., Bhatt B. & Bujarbaruah K. (2004). An outbreak of *Riemerella anatipestifer* infection in ducks in Meghalaya. *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases.* 25: 126-127.
- Soman M., Nair S.R., Mini M., Mani B.K. & Joseph S. (2014). Isolation and polymerase chain reaction-based identification of *Riemerella anatipestifer* from ducks in Kerala, India. *Vet World.* 7: 765-769.
- Surya P., Priya P. & Mini M. (2016). Biotyping and antibiogram of *Riemerella anatipestifer* from ducks in Kerala. *Biosci Biotech Res Commun.* 9: 457-462.
- Tzora A., Skoufos S., Bonos E., Fotou K., Karamoutsios A., Nelli A., Giannenas I., Tsinas A. & Skoufos I. (2021). Identification by MALDI-TOF MS and Antibiotic Resistance of *Riemerella anatipestifer*, Isolated from a Clinical Case in Commercial Broiler Chickens. *Veterinary Sciences.* 8: 29.
- Võ Thành Thìn, Đặng Văn Tuấn & Lê Đình Hải (2020).. Phân lập vi khuẩn *Riemerella anatipestifer* từ mẫu bệnh phẩm vịt có triệu chứng nghi mắc bệnh nhiễm trùng huyết. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y.* 17(3): 26-31.
- Wang X., Zhu D., Wang M., Cheng A., Jia R., Chen S., Chen X. & Tang T. (2012a). Development and application of specific polymerase chain reaction assay targeting the *gyrB* gene for rapid detection of *Riemerella anatipestifer*. *Poultry science.* 91: 2450-2453.
- Wang X., Zhu D., Wang M., Cheng A., Jia R., Zhou Y., Chen Z., Luo Q., Liu F. & Wang Y. (2012b). Complete genome sequence of *Riemerella anatipestifer* reference strain. *Am Soc Microbiol.*