Vietnam J. Agri. Sci. 2018, Vol. 16, No. 12: 1068-1078 Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2018, 16(12): 1068-1078
www.vnua.edu.vn

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH SEROTYP CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN *Haemophilus parasuis* PHÂN LẬP TỪ LỢN TẠI TỈNH THANH HÓA, HƯNG YÊN VÀ HÀ NAM

Trương Quang Lâm*, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Thị Huyên

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

**Tác giả liên hệ: tqlam@vnua.edu.vn*

Ngày nhận bài: 30.07.2018 Ngày chấp nhận đăng: 05.03.2019

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập và xác định các tuýp huyết thanh (serotyp) của các chủng vi khuẩn *Haemophilus parasuis* phân lập từ lợn nghi mắc bệnh Glasser. Tổng số 205 mẫu bệnh phẩm gồm dịch ngoáy mũi, dịch ngoáy khí quản, dịch khớp, tim, phổi thu thập từ 41 lợn thuộc địa bàn 3 tỉnh Thanh Hóa, Hưng Yên, Hà Nam đã được sử dụng trong nghiên cứu. Hai mươi hai chủng nghi ngờ đã được phân lập đặc điểm như sau: khuẩn lạc kích thước nhỏ, trong suốt, không dung huyết, bắt màu Gram âm, trực khuẩn đa hình thái, catalase, oxidase và yếu tố V dương tính, indol và urease âm tính, có khả năng lên men đường glucose, galactose, fructose, sucrose và không mọc trên môi trường MacConkey. Có 20/22 chủng phân lập cho kết quả giám định PCR dương tính với *H. parasuis*. Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam ứng dụng phương pháp multiplex PCR (mPCR) trong việc xác định các serotyp của vi khuẩn *H. parasuis*. Kết quả mPCR cho thấy các serotyp (serotyp) của vi khuẩn *H. parasuis* phân lập từ thực địa rất đa dạng. Đáng chú ý, seroype 4, 5 và 1 là phổ biến nhất với tỷ lệ lần lượt 30%, 25% và 15%, tiếp theo là serotyp 13 với 5%, serotyp 2 với 5%, các chủng chưa xác định được serotyp chiếm 20%.

Từ khóa: *Haemophilus parasuis*, phân lập, PCR, multiplex PCR, serotyp.

Isolation and Serotyping of *Haemophilus parasuis* Strains from Pigs Raised in the Provinces of Thanh Hoa, Hung Yen, and Ha Nam of Northern Vietnam

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the serotypes of *Haemophilus parasuis* strains isolated from suspected pig cases of glasser disease. A total of 205 specimens including nasal, trachea, joint fluids, heart and lung collected from 41 suspected pigs in Thanh Hoa, Hung Yen and Ha Nam province were used for bacterial isolation and identification. The isolates (22 isolates in total) of *H. parasuis* from pigs suspected of being infected with *H. parasuis* showed the major characteristics of small, transparent, and non-hemolytic colonies, gram negative, pleomorphic rod from short to long bacilli, catalase, oxidase and V factor positive, indole and urease negative, and capable of fermentating glucose, galactose and fructose, and unable to grow on MacConkey agar. These isolates were confirmed by specific PCR as *H. parasuis*. In the present study, for the first time, we reported the application of multiplex PCR assay for serotype determination of *H. parasuis* isolates from the field in Vietnam. mPCR results showed variable distributions in the serotypes of *H. parasuis* isolated from the field. Remarkably, serotypes 4, 5 and 1 were the most prevalent with 25%, 25% and 15%, respectively, followed by serotypes 13 and 2 with 5%, and non-typable serotype with 20%.

Keywords: *Haemophilus parasuis*, isolation, PCR, multiplex PCR, serotype.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Glasser do vi khuẩn Gram âm từ dịch tiết, fibrin bám dính của lợn bị ảnh hưởng bởi viêm thanh dịch có tơ huyết ở màng não, màng phổi, màng ngoài tim, phúc mạc và viêm khớp đã được mô tả lần đầu tiên bởi Glasser vào năm 1910 (Little *et al.,* 1970; Nedbalcov *et al.*, 2006). Tuy nhiên, Schermer & Ehrlich mới là người phân lập đầu tiên nhóm vi khuẩn này vào năm 1922 (Little *et al.,* 1970). Đến năm 1943, bệnh đã được Hiarre & Wramby nghiên cứu phân loại

chi tiết dựa trên các đặc tính sinh hóa, đặc tính loài và được đặt tên là *Haemophilus suis*. Năm 1969, Biberstein và White đã chứng minh rằng sự sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh Glasser trên lợn chỉ phụ thuộc vào yếu tố NAD. Tuy nhiên, Kilian *et al.* (1976) đã tiến hành phân loại các chủng vi khuẩn *Haemophilus* và đặt tên *H. suis* là *Haemophilus parasuis*. Vi khuẩn *H. parasuis* có đặc điểm sau: Trực khuẩn Gram âm, có tiêm mao và giáp mô, cần yếu tố V, hiếu khí hay yếm khí tùy ý, không gây dung huyết. Vi khuẩn này thường nhiễm ghép với lợn bị bệnh tai xanh (virus PRRS) gây ra nhiều thiệt hại kinh tế cho ngành chăn nuôi lợn khắp nơi trên thế giới (Solano *et al.,* 1997). *H. parasuis* có 15 serotyp khác nhau, trong đó một số serotyp có độc tính cao và gây tử vong trong vòng 4 ngày như serotyp 1, 5, 10, 12, 13 và 14 (Kielstein *et al.,* 1990; Nedbalcov *et al.,* 2006). Do sự đa dạng về các serotyp hiện diện trên đàn lợn tại các quốc gia và ở các vùng địa lý khác nhau và đáp ứng miễn dịch chéo giữa các serotyp nên rất khó để phát triển một loại vacxin bảo vệ có hiệu quả có thể sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới (Nedbalcov *et al.,* 2006). Do đó, thuốc kháng sinh vẫn đóng một vai trò quan trọng và được chứng minh có hiệu quả trong điều trị và kiểm soát bệnh Glasser trên lợn (Aarestrup *et al.,* 2004; Aragon *et al.,* 2012; Vilalta *et al.,* 2012).

Trong những năm gần đây, kỹ thuật sinh học phân tử multiplex PCR với độ đặc hiệu, chính xác và tin cậy cao đã được sử dụng rộng rãi trên thế giới trong xác định các serotyp của vi khuẩn *H. parasuis*. Kỹ thuật mPCR sử dụng các cặp primers đặc hiệu được phát triển dựa trên các gen mã hóa sinh tổng hợp các cấu trúc polysaccharide ngoại bào, như kháng nguyên O có bản chất là lipopolysaccharides (LPS) và kháng nguyên vỏ capsules chính của vi khuẩn *H. parasuis* (Howell *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Aiqing *et al.*, 2017). Các công trình nghiên cứu sử dụng phương pháp mPCR đã xác định được 15 serotyp tham chiếu (serotyp từ 1 tới 15) của vi khuẩn *H. parasuis*. So sánh với phương pháp xét nghiệm cổ điển khuếch tán miễn dịch trên thạch (AGID, agar gel-immuno-diffusion test), phương pháp mPCR cho kết quả có độ nhạy và đặc hiệu cao hơn (Howell *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Aiqing *et al.*, 2017).

Tại Việt Nam, cùng với sự phát triển của ngành chăn nuôi thì dịch bệnh cũng phát sinh, lây lan và gây thiệt hại lớn về kinh tế. Một trong những bệnh thường xảy ra trong những năm gần đây là bệnh Tai xanh hay Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrom virus-PRRSV). Virus PRRS tấn công và tiêu diệt các đại thực bào ở phổi dẫn đến hiện tượng suy giảm miễn dịch ở lợn, tạo điều kiện thuận lợi cho các vi khuẩn gây bệnh kế phát trên đường hô hấp như *Actinobacillus pleuropneumonia*e, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* serotyp 2, *Bordetella bronchiseptica* (Nguyễn Hữu Nam và Nguyễn Thị Lan, 2007; Bùi Quang Anh và cs., 2008; Cù Hữu Phú, 2011). Ngoài ra, sự hiện diện của bệnh Glasser do vi khuẩn *H. parasuis* gây ra, cũng đã được ghi nhận tại Việt Nam với các triệu trứng lâm sàng và bệnh tích điển hình trên lợn bệnh cũng như lợn nhiễm bệnh Tai xanh hoặc hội chứng gầy còm sau cai sữa. Sự nhiễm khuẩn kế phát do vi khuẩn *H. parasuis* trên những đàn lợn mắc bệnh PRRS là rất phổ biến trên thế giới, thường dẫn đến tỉ lệ tử vong cao ở lợn con từ 6-14 tuần tuổi (Palzer *et al.,* 2015). Nhiều công bố khoa học trên thế giới đã phân lập, xác định các serotyp có độc lực cao của vi khuẩn *H. parasuis* và chứng minh hiện tượng này (Palzer *et al.,* 2015). Gần đây, Lâm Thị Thu Hương và cs. (2012) đã tiến hành khảo sát các vi khuẩn đồng nhiễm trên lợn mắc hội chứng gầy còm sau cai sữa (PCV2) tại các trại lợn trên địa bàn hai tỉnh miền Đông Nam bộ. Kết quả phát hiện trực tiếp bằng phương pháp PCR cho thấy tỉ lệ lợn nhiễm vi khuẩn *H. parasuis* đạt ở mức cao với 17,5% trong nhóm lợn bị nhiễm virus PCV2. Trong một nghiên cứu khác, Lê Văn Lãnh và cs. (2012) đã tiến hành khảo sát các vi khuẩn đồng nhiễm trên lợn nghi mắc bệnh suyễn do *Mycoplasma* tại trại lợn tại một số tỉnh phía Bắc, kết quả cho thấy tỉ lệ lợn nhiễm vi khuẩn *H. parasuis* đạt ở mức 11,32% trong tổng số 106 mẫu xét nghiệm.

Mặc dù được coi là mầm bệnh truyền nhiễm quan trọng trên lợn, các nghiên cứu để phân lập và giám sát sự lưu hành các serotyp của vi

khuẩn *H. parasuis* tại Việt Nam hiện còn rất hạn chế. Do đó, nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích phân lập và xác định các serotyp đang lưu hành và gây bệnh trên lợn của vi khuẩn *H. parasuis* tại một số tỉnh phía Bắc tại Việt Nam. Kết quả nghiên cứu sẽ là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm phát triển vacxin phù hợp, có hiệu quả, giảm thiểu thiệt hại do *H. parasuis* gây ra cho người chăn nuôi đồng thời nâng cao khả năng phòng chống dịch bệnh trên đàn lợn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Lợn nghi mắc bệnh Glasser: Mẫu bệnh phẩm bao gồm dịch ngoáy xoang mũi, dịch ngoáy khí quản, dịch khớp, phổi, tim được thu thập từ mỗi lợn có triệu trứng, bệnh tích nghi mắc bệnh Glasser tại các địa bàn thuộc tỉnh Thanh Hóa, Hưng Yên, Hà Nam trong khoảng thời gian từ tháng 12/2016 đến 10/2017. Đối với lợn được mổ khám tại khu vực xử lý mẫu của phòng thí nghiệm, mẫu bệnh phẩm tại các vị trí khác nhau được giữ riêng biệt trong các hộp, túi đựng mẫu, cho vào thùng chuyển mẫu và chuyển thẳng lên phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập. Đối với mẫu được mổ khám tại thực địa, các mẫu được giữ trong các túi đựng mẫu riêng biệt cho từng vị trí lấy mẫu, giữ trong thùng bảo ôn (2-8°C) và chuyển đến phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập trong vòng 24 giờ.

Môi trường, hóa chất sử dụng bao gồm: Thạch blood agar base (BD); Tryptic soya broth - TSB (Merck); Thạch MacConkey (BD); Catalase (Hydrogen peroxide 3%, Merck); Oxidase (1% N, N-dimethyl-p-phenylenediamine hydrochloride, Sigma); Kovac's/Indol (Merck); Urea base (BD); Bộ kit nhuộm Gram (Merck); Glucose (Merck); Lactose (Merck); Galactose (Merck); Fructose (Merck); Sucrose (Sigma); Mannitol (Merck); Nicotinamide adenine dinucleotide sodium salt (NAD, Sigma); Huyết thanh thai bò (FBS-Fetal bovine serum, Gibco); Kit chiết tách DNA (QIAGEN); GoTaq PCR green (Promega).

2.2. Nuôi cấy và phân lập vi khuẩn *H. parasuis*

Các mẫu bệnh phẩm được nuôi cấy trên môi trường thạch máu sử dụng 5% máu thỏ (RBA) và 5% máu cừu (SBA) có kèm đường cấy vi khuẩn *S. aureus* ở điều kiện hiếu khí 37°C với 5% CO_2 trong thời gian 24-48 giờ. Các đĩa thạch được kiểm tra hàng ngày về khả năng mọc và sự phát triển của khuẩn lạc. Các khuẩn lạc nghi ngờ vi khuẩn *H. parasuis* được cấy chuyển sang môi trường thạch tương tự hoặc môi trường tăng sinh tryptic soy broth (TSB) có bổ sung 0,01% yếu tố V-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) và huyết thanh để giám định đặc tính sinh hóa học: nhuộm Gram, thử các phản ứng catalase, indol, urease, oxidase, cAMP, khả năng phụ thuộc vào yếu tố V (NAD), khả năng dung huyết, khả năng lên men đường glucose, galactose, fructose, sucrose, mannitol, lactose và khả năng mọc trên môi trường MacConkey.

2.3. Tách chiết DNA từ mẫu

Canh khuẩn hoặc khuẩn lạc sau nuôi cấy của các chủng riêng biệt cần xét nghiệm được tách chiết DNA tổng số sử dụng kit tách chiết QIAamp DNA Extraction Kit (Qiagen, Mỹ) theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR hay mPCR được cắt và tách chiết từ gel sau điện di sử dụng kit tách chiết QIA quick Gel Extraction Kit (Qiagen, Mỹ) theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.4. Giám định vi khuẩn *H. parasuis* bằng phương pháp PCR

DNA của vi khuẩn được tách chiết sử dụng Kit chiết tách DNA thương mại QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). 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 HPS-F/HPS-R (Bảng 1) khuếch đại đoạn gene 16S rRNA của vi khuẩn *H. parasuis* (Oliveira *et al.,* 2001). Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 6,5 µL nuclease-free water; 12,5 µL 2X Go Taq green master mix (Promega); 1 µL reverse primer (10 pmole HPS-F); 1 µL forward primer

(10 pmole HPS-R); 5 µL khuôn mẫu DNA. Đối chứng dương sử dụng trong phản ứng PCR là chủng VNUA-HP02 phân lập từ lợn bệnh tại Phú Thọ vào 10/2016. Chủng VNUA-HP02 có đầy đủ các đặc tính đặc trưng về nhuộm Gram, hình thái, đặc tính sinh hóa và trình tự gene 16S rRNA tương đồng 99,03-100% với các chủng vi khuẩn *H. parasuis* tham chiếu trên thế giới (phân tích bằng phần mềm MEGA6 và dữ liệu Genbank thông qua phân tích BLAST của NCBI). Chu trình nhiệt được thực hiện gồm 3 bước bao gồm: Tiền biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút; Chu kỳ lặp lại 30 lần: Biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 56°C trong 60 giây, tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 90 giây; Hoàn thành ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel 1,2% (TBE 1X) với thang DNA chuẩn 100 bp (marker). Sử dụng nguồn điện di ở hiệu điện thế 100V cường độ 100 mA, thời gian chạy điện di trong 35 phút. Sản phẩm PCR cho sản phẩm có độ dài 821 bp.

2.5. Định serotyp vi khuẩn *H. parasuis* bằng phương pháp multiplex PCR

Phản ứng mPCR được dùng để xác định serotyp của các chủng phân lập sử dụng các cặp mồi đặc hiệu được liệt kê ở bảng 1 (Howell *et al.,* 2015; Aiqing *et al.,* 2017). Thành phần 30µl phản ứng mPCR bao gồm: 6 µL GoTaq green 5X (Promega, Mỹ), 1,5 units GoTaq DNA polymerase (Promega, Mỹ), 0,75 µL hỗn hợp dNTPs (10 mM; Promega, Mỹ) gồm 0, 25 mM mỗi dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$ (Promega, Mỹ), 30 pmole mỗi primer, nuclease-free water (Promega, Mỹ), và khuôn mẫu DNA. Hai phản ứng mPCR được sử dụng bao gồm (mPCR1) các cặp mồi HP1, HP2, HP4, HP5-HP12, HP10, HP13, HP14, HP15 và (mPCR2) các cặp mồi HP3, HP6, HP7, HP8, HP9, HP11. Đối chứng dương (VNUA-HP02) sử dụng trong mPCR đã được xác định là serotyp 4 trước đó bằng phương pháp mPCR, tinh khiết DNA từ gel, giải trình tự *wciP* gene và phân tích bằng phần mềm MEGA6 và dữ liệu Genbank thông qua phân tích BLAST của NCBI. Chu trình nhiệt được thực hiện gồm 3 bước bao gồm: Tiền biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút; Chu kỳ lặp lại 30 lần: Biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 58°C trong 60 giây, tổng hợp kéo dài ở 72°C trong 90 giây; Hoàn thành ở 72°C trong 7 phút. Đối với các chủng dương tính mPCR sử dụng cặp mồi HP5-12F/HP5-12R cần tiến hành thêm phản ứng PCR sử dụng cặp mồi HP12F/HP12F đặc hiệu cho serotype 12 để chẩn đoán phân biệt serotype 5 và 12 (Thành phần và điều kiện phản ứng như trình bày ở mục 2.4). Sản phẩm PCR được điện di trên gel 1.2% (TBE 1X) với thang DNA chuẩn 100 bp (marker). Sử dụng nguồn điện di ở hiệu điện thế 100V cường độ 100 mA, thời gian chạy điện di trong 35 phút. Sản phẩm PCR cho sản phẩm có độ dài như mô tả ở bảng 1.

2.6. Xử lý số liệu

Các biểu đồ, tỷ lệ, số trung bình, trình tự gen được sử lý và tính toán trong phần mềm Excel 2013, GraphPad Prism 6, MEGA 6 và BLAST của NCBI.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Lựa chọn môi trường phân lập vi khuẩn *H. parasuis*

Từ 20 mẫu bệnh phẩm thu thập ở 5 lợn nghi mắc bệnh Glasser (Bảng 1, Hình 1), chúng tôi đã tiến hành so sánh hai môi trường phân lập vi khuẩn *H. parasuis* bao gồm môi trường 1 sử dụng môi trường thạch máu với 5% máu thỏ (RBA) và môi trường 2 sử dụng tiêu chuẩn với 5% máu cừu (SBA) để lựa chọn được môi trường phù hợp. Kết quả phân lập sử dụng hai môi trường được trình bày ở bảng 2.

Các mẫu bệnh phẩm được nuôi cấy trên môi trường thạch máu thỏ (RBA) và máu cừu (SBA) có kèm đường cấy vi khuẩn *S. aureus* ở điều kiện 37°C, 5% CO_2 và theo dõi khuẩn lạc mọc trong thời gian từ 24 đến 48 giờ. Các chủng phân lập nghi ngờ vi khuẩn *H. parasuis* tạo khuẩn lạc với kích thước nhỏ, trong suốt, không dung huyết, mọc xung quanh đường cấy *S. aureus*, vi khuẩn bắt màu Gram âm, trực khuẩn đa hình thái, từ dạng trực khuẩn ngắn đến dạng sợi nhỏ mảnh dài. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng, không có sự sai khác về kết quả

phân lập vi khuẩn *H. parasuis* khi sử dụng 5% máu thỏ hay 5% máu cừu, cho tỷ lệ phân lập 55% (11/20) từ cùng mẫu bệnh phẩm. Các khuẩn lạc nghi ngờ phân lập từ môi trường RBA và SBA đều cho kết quả PCR dương tính (HPS-F/HPS-R) với DNA của vi khuẩn *H. parasuis*. Ngoài ra, các chủng vi khuẩn được kiểm tra trên hai môi trường SBA và RBA đều tạo khuẩn lạc có hình thái, kích thước, thời gian và khả năng mọc giống nhau (Hình 1). Đối với môi trường thạch máu, máu cừu thông thường được sử dụng rộng rãi tại các phòng thí nghiệm trên toàn thế giới để phân lập vi khuẩn *H. parasuis* (Moller *et al.,* 1990; Turni *et al.,* 2010). Với điều kiện tại Việt Nam, máu cừu thường khó mua và giá thành đắt, chính vì vậy nhóm tác giả sử dụng máu thỏ trong nghiên cứu này. Kết quả cho thấy khả năng phân lập tương đương sau khi thay thế máu cừu bằng máu thỏ (Bảng 2). Kết quả có ý nghĩa quan trọng trong việc tiêu chuẩn quy trình chẩn đoán phân lập, tiết kiệm kinh phí nguyên liệu cũng như chủ động môi trường phân lập hơn so với sử dụng máu cừu.

3.2. Phân lập vi khuẩn *H. parasuis* từ các loại mẫu bệnh phẩm

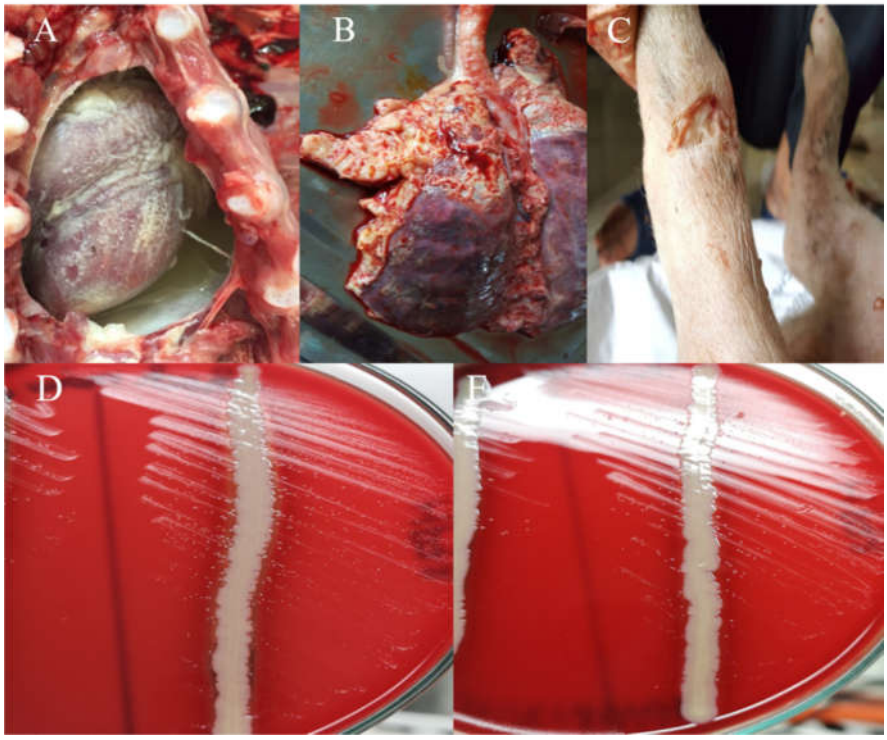
Kết quả phân lập vi khuẩn *H. parasuis* từ 205 mẫu bệnh phẩm thu thập ở 41 lợn nghi mắc bệnh Glasser được trình bày tại bảng 3. Các khuẩn lạc nghi ngờ được phân lập từ các loại mẫu bệnh phẩm và xét nghiệm bằng phương pháp nhuộm Gram, đánh giá hình thái, đặc tính mọc xung quanh hoặc xa đường cấy *S. aureus*, khả năng mọc trên môi trường thạch MacConkey và đặc tính sinh hóa chính bao gồm phản ứng catalase, oxidase, urease, indol và khả năng dung huyết. Kết quả phân lập từ các mẫu bệnh phẩm nghiên cứu cho thấy 66 khuẩn lạc nghi ngờ vi khuẩn *H. parasuis* đã được phân lập từ 22 lợn nghi mắc bệnh Glasser, chiếm tỷ lệ cao với 53,65% (22/41). Trong tổng số 205 mẫu bệnh phẩm nghiên cứu, tỷ lệ các khuẩn lạc nghi ngờ là vi khuẩn *H. parasuis* từ dịch ngoáy khí quản và phổi chiếm tỷ lệ cao nhất với 41,46% (17/41), tiếp theo là dịch ngoáy mũi 36,58% (15/41), tim với với 24,39% (10/41) và dịch khớp với 17% (7/41).

Bảng 1. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Primer	Forward primer sequence (5' → 3')	Reverse primer sequence (5' → 3')	Gene	Size (bp)
HPS	GTGATGAGGAAGGGTGGTGT	GGCTTCGTCACCCTCTGTA	16S rRNA	821
HP1	CTGTGTATAATCTATCCCCGATCATCAGC	GTCCAACAGAATTTGGACCAATTCCTG	*funB*	180
HP2	CTAACAAGTTAGGTATGGAGGGTTTTGGT	GGCACTGAATAAGGGATAATTGTACT	*wzx*	295
HP3	TTAAAGTTTTGATTTGTCAATG	ATGACTAAAAAAATTTTAGTTACAG	*dgdA*	1068
HP4	AGGAGGTTAAGAGGTAGAGC	CCACAACAGCTCTAGAAACC	*wciP*	348
HP5-12	CCACTGGATAGAGAGTGGCAGG	TTCTAGGGAACCAGCCATGA	*wcwK*	450
HP6	ATGAGTATTTTTTTTCTAATTG	TTCCCTGATCATTGTAGTAACC	*funL*	443
HP7	CTCCGATTTCATCTTTTCTATGTGG	CGATAAACCATAACAATTCCTGGCAC	*funQ*	500
HP8	CAGCAGGTTCTATGGAGTCA	CACATTATAACTTTCTTT	*scdA*	350
HP9	AGCCACATCAATTTTAGCCTCATCA	CCTTTAATAGCCTATGTCTGTACC	*funV*	710
HP10	GGTGACATTTATGGGCGAGTAAGTC	GCACTGTCATCAATAACAATCTTAAGA	*funX*	790
HP11	CCATCTCTTTAACTAATGGGACTG	GGACGCCAACCAGTATTATCAAATG	*amtA*	890
HP12	ATGGCTCACGATCCGAAAG	ATTTCCCTTTCCTAAACGC	*Hypothetical*	508
HP13	GCTGGAGGAGTTGAAAGAGTTGTTAC	CAATCAAATGAAACAACAGGAAGC	*gltP*	840
HP14	GCTGGTTATGACTATTTCTTTCGCG	GCTCCCAAGATTAAACCACAAGCAAG	*funAB*	730
HP15	CAAGTTCGGATTGGGAGCATATATC	CCTATATCATTTGTTGGATGTACG	*funI*	550

Bảng 2. Kết quả lựa chọn môi trường phân lập vi khuẩn *H. parasuis* từ các loại bệnh phẩm

Bệnh phẩm	Số xét nghiệm	Môi trường RBA		Môi trường SBA	
		Số khuẩn lạc nghi *H. parasuis*	Tỷ lệ (%)	Số khuẩn lạc nghi *H. parasuis*	Tỷ lệ (%)
Dịch ngoáy khí quản	5	4	80	4	80
Dịch khớp	5	2	40	2	40
Tim	5	2	40	2	40
Phổi	5	3	60	3	60



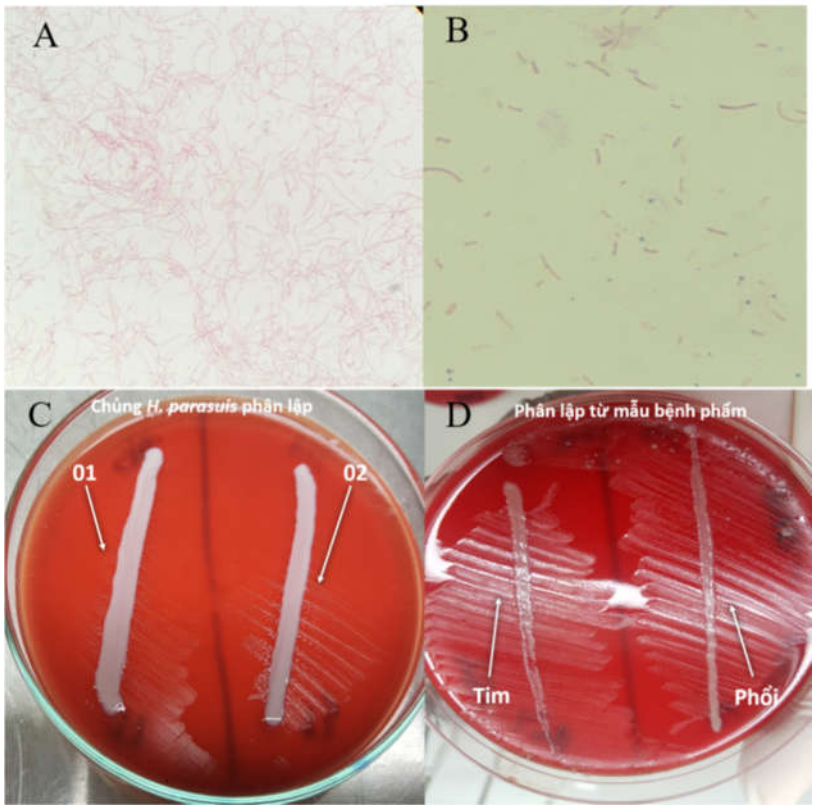
Ghi chú: A - Viêm fibrin màng bao tim, có dịch; B - Viêm màng phổi phủ fibrin; C - Viêm khớp có dịch; D - Vi khuẩn H. parasuis mọc trên môi trường thạch máu cừu; E- Vi khuẩn H. parasuis mọc trên môi trường thạch máu thỏ.

Hình 1. Hình ảnh bệnh tích điển hình ở lợn nhiễm bệnh Glasser và khả năng mọc của vi khuẩn *H. parasuis* trên môi trường thạch máu

H. parasuis là vi khuẩn khu trú ở đường hô hấp trên, do đó tỷ lệ phân lập vi khuẩn này ở dịch ngoáy mũi, dịch ngoáy khí quản, phổi hay dịch khớp khá cao (Olivera, 2004; Turni *et al.*, 2007). Tuy nhiên, việc phân lập vi khuẩn *H. parasuis* từ dịch ngoáy mũi không được khuyến cáo vì thường mất nhiều công sức và thời gian, do có rất nhiều nhóm vi khuẩn khác nhau khu trú ở đường hô hấp trên của lợn. Tỷ lệ các chủng phân lập từ các vị trí lấy mẫu hay loại mẫu bệnh phẩm trong nghiên cứu này (66/205 chiếm 32,19%) phù hợp với nghiên cứu trước đây của Turni *et al.* (2007) khi tiến hành phân lập vi khuẩn *H. parasuis* từ các loại mẫu bệnh phẩm thu thập từ lợn nhiễm bệnh. Kết quả cho thấy, với các mẫu bệnh phẩm từ lợn có triệu chứng và bệnh tích đặc trưng của bệnh Glasser như lợn sốt cao, ho, thở thể bụng, ăn kém, gầy sút cân, sưng khớp, mổ khám có bệnh tích viêm fibrin bám dính ở màng phổi, màng tim, xoang bụng, xoang bao tim viêm tích nước, viêm đa khớp cho tỷ lệ phân lập vi khuẩn *H. parasuis* cao.

Bảng 3. Kết quả phân lập vi khuẩn *H. parasuis* từ các loại bệnh phẩm

Bệnh phẩm	Số mẫu xét nghiệm	Môi trường RBA	
		Khuẩn lạc nghi *H. parasuis*	Tỷ lệ (%)
Dịch ngoáy mũi	41	15	36,58
Dịch ngoáy khí quản	41	17	41,46
Dịch khớp	41	7	17
Tim	41	10	24,39
Phổi	41	17	41,46
Tổng	205	66	32,19



Ghi chú: A, B - Vi khuẩn bắt màu Gram âm, trực khuẩn đa hình thái, từ dạng trực khuẩn ngắn đến dạng sợi nhỏ mảnh dài; C, D - Chủng phân lập của vi khuẩn H. parasuis trên thạch máu thỏ tạo khuẩn lạc với kích thước nhỏ, trong suốt, không dung huyết, mọc xung quanh đường cấy S. aureus.

Hình 2. Hình thái vi khuẩn *H. parasuis* từ các chủng phân lập được

3.3. Giám định đặc tính sinh hóa học của các chủng phân lập

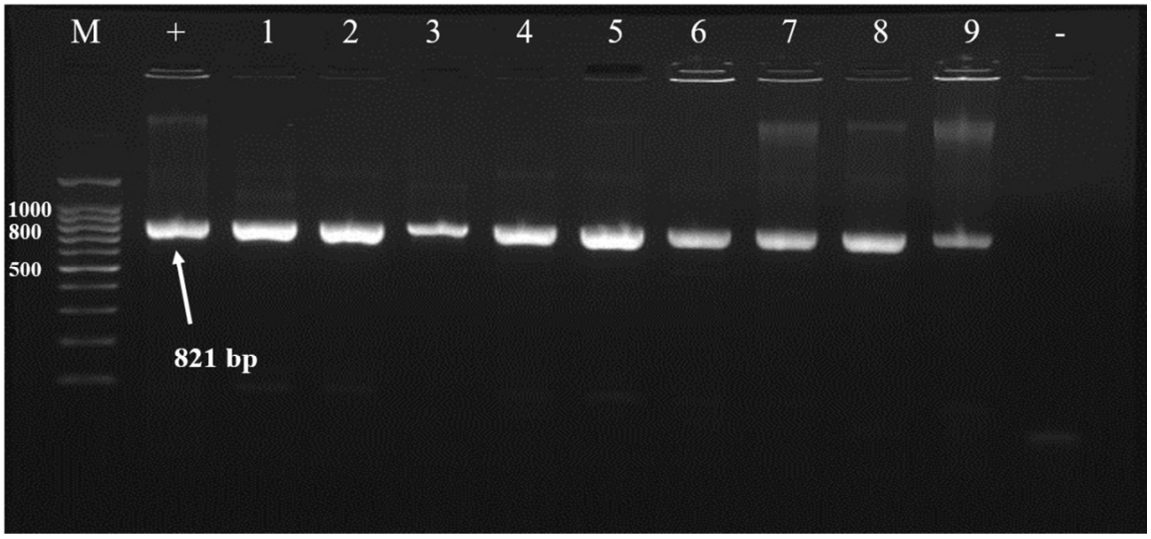
Tổng số 66 khuẩn lạc nghi ngờ được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm dịch ngoáy mũi, dịch ngoáy khí quản, phổi, tim và dịch khớp của 22 lợn xét nghiệm trên. Qua sàng lọc các khuẩn lạc nghi ngờ của mỗi lợn xét nghiệm, có 22 chủng phân lập nghi ngờ vi khuẩn *H. parasuis* từ 22 lợn xét nghiệm được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả giám định đặc tính sinh hóa học của các chủng phân lập nghi ngờ là vi khuẩn *H. parasuis* (Bảng 4) cho thấy 22/22 (100%) chủng vi khuẩn đều bắt màu Gram âm và cho kết quả âm tính với phản ứng urease,

cAMP và indol. Có 22 và 20 trong tổng số 22 chủng phân lập xét nghiệm cho kết quả lần lượt dương tính với phản ứng oxidase và catalase. Các chủng vi khuẩn phân lập hầu hết đều phụ thuộc vào yếu tố V (20/22), không có khả năng dung huyết (hemolysis) và không phát triển trên môi trường thạch MacConkey. Cả 22 chủng đều có khả năng lên men đường glucose, galactose, fructose, sucrose và không có khả năng lên men đường mannitol, lactose.

Bảng 4. Kết quả giám định sinh hóa các chủng nghi ngờ vi khuẩn *H. parasuis*

Chỉ tiêu xét nghiệm	Số chủng test	Kết quả tham chiếu	Kết quả xét nghiệm (Tỷ lệ%)
Bắt màu Gram âm	22	+	22/22 (100)
Hemolysis	22	–	22/22 (100)
cAMP	22	–	22/22 (100)
Urease	22	–	22/22 (100)
Yếu tố V$^{\alpha}$	22	+	20/22 (91)
Oxidase	22	+	22/22 (100)
Catalase$^{\alpha}$	22	+	20/22 (91)
Indol	22	–	22/22 (100)
Glucose	22	+	22/22 (100)
Galactose	22	+	22/22 (100)
Mannitol	22	–	22/22 (100)
Lactose	22	–	22/22 (100)
Sucrose	22	+	22/22 (100)
Fructose	22	+	22/22 (100)
MacConkey	22	–	22/22 (100)

Ghi chú: α: 2/22 chủng cho kết quả dương tính nhẹ đối với phản ứng catalase và không phụ thuộc vào yếu tố V.



Ghi chú: Giếng thang DNA chuẩn 100 bp (M-Maker); Giếng 2: Đối chứng dương VNUA-HP02 (+); Giếng 3 đến giếng 11: sản phẩm PCR của các chủng vi khuẩn H. parasuis phân lập từ lợn bệnh, theo thứ tự lần lượt 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9; Giếng 12: Đối chứng âm (-).

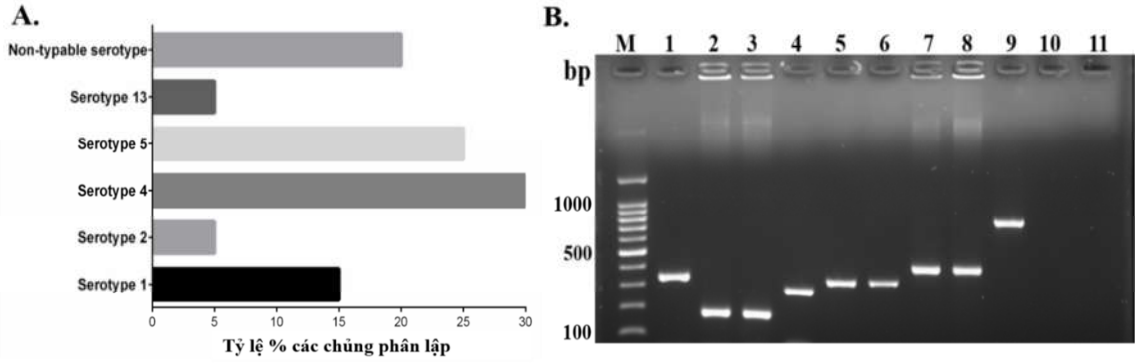
Hình 3. Kết quả giám định các chủng phân lập vi khuẩn *H. parasuis* bằng phản ứng PCR

Quan sát đặc tính mọc của các chủng vi khuẩn trên môi trường nuôi cấy cho thấy có 10/22 chủng mọc bình thường và 12/22 chủng mọc yếu trên môi trường nuôi cấy. Cả 22 khuẩn lạc nghi ngờ phân lập được từ các tỉnh Thanh Hóa, Hưng Yên, Hà Nam đều có đặc tính sinh hóa học phù hợp với các nghiên cứu trước đây về vi khuẩn *H. parasuis* (Keilstein *et al.,* 2001; Olivera *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2017).

Nghiên cứu giám định 22 chủng phân lập bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu HPS-F/HPS-R để phát hiện DNA của vi khuẩn *H. parasuis*. Kết quả giám định bằng phản ứng PCR cho thấy 20/22 chủng phân lập cho kết quả PCR dương tính với DNA của vi khuẩn *H. parasuis* cho sản phẩm PCR có độ dài 821 bp như thiết kế (Hình 3).

3.4. Định serotyp của các chủng vi khuẩn *H. parasuis* phân lập tại các địa phương nghiên cứu

Các serotyp của các chủng phân lập vi khuẩn *H. parasuis* đã được xác định bằng kỹ thuật sinh học phân tử mPCR. Kết quả mPCR cho thấy 16/20 chủng vi khuẩn *H. parasuis* dương tính với serotyp 1, 2, 4, 5/12 và 13 cho sản phẩm PCR có độ dài như thiết kế (Bảng 1; Hình 4). Do cặp mồi HP5-12-F/HP5-12-R không thể phân biệt serotyp 5 hoặc 12, chúng tôi sử dụng cặp mồi đặc hiệu HP12F/HP12R để phân biệt các serotyp này (Aiqing *et al.,* 2017). Kết quả xét nghiệm PCR sử dụng cặp mồi HP12F/HP12R cho thấy cả 5 chủng vi khuẩn xét nghiệm (dương tính với cặp mồi HP5-12F/HP5-12-R) đều âm tính với serotyp 12 (0/5). Phân tích kết quả cho thấy sự đa dạng các serotyp trong số các chủng vi khuẩn *H. parasuis* phân lập được từ thực địa các tỉnh Thanh Hóa, Hưng Yên và Hà Nam (Hình 4). Đáng chú ý, serotyp 4, 5 và 1 là phổ biến nhất với tỷ lệ lần lượt 30% (6/20), 25% (5/20) và 15% (3/20). Chiếm tỷ lệ thấp hơn lần lượt là các chủng vi khuẩn thuộc serotyp 13 với 5% (1/20), serotyp 2 với 5% (1/20). Tuy nhiên, các chủng phân lập chưa xác định được serotyp (non-typable serotyp) chiếm 20% (4/20). Số lượng các chủng vi khuẩn *H. parasuis* chưa xác định serotyp thường được đề cập nhiều trong hầu hết các nghiên cứu trên thế giới (Keilstein *et al.,* 2001; Olivera *et al.,* 2004; Howell *et al.,* 2015; Pereira *et al.,* 2017; Aiqing *et al.*, 2017). Các nhà khoa học hiện vẫn đang nỗ lực nghiên cứu phát triển các phương pháp chẩn đoán, phân tích genome để phát hiện các serotyp mới của vi khuẩn *H. parasuis* gây bệnh trên lợn trên toàn thế giới.



Ghi chú: A - Tỷ lệ% các serotyps của các chủng vi khuẩn H. parasuis phân lập tại thực địa; B- Kết quả mPCR xác định các serotyp từ các chủng vi khuẩn H. parasuis phân lập tại thực địa. Giếng M: thang DNA chuẩn 100 bp (Maker); Giếng 1: Đối chứng dương VNUA-HP02 serotyp 4 (HP4); Giếng 2-3: các chủng phân lập serotyp 1 (HP1); Giếng 4: chủng phân lập serotyp 2 (HP2); Giếng 5-6: các chủng phân lập serotyp 4 (HP4); Giếng 7-8: các chủng phân lập serotyp 5 (HP5); Giếng 9: chủng phân lập serotyp 13 (HP13); Giếng 10: chủng phân lập non-typable serotyp; Giếng 11: Đối chứng âm.

Hình 4. Tỷ lệ các serotyp lưu hành của vi khuẩn *H. parasuis* phân lập từ lợn thuộc địa bàn tỉnh Thanh Hóa, Hưng Yên, Hà Nam

Mặc dù trong nghiên cứu này lượng mẫu được thu thập dùng để chẩn đoán phân lập mầm bệnh chưa đủ lớn, kết quả thực tế cho thấy tỷ lệ nhiễm rất cao đối với vi khuẩn *H. parasuis* ở các địa phương thu thập mẫu bệnh phẩm. Yếu tố dịch tễ bệnh, đặc biệt sự lưu hành của các serotyp khác nhau của vi khuẩn *H. parasuis* phụ thuộc vào vùng địa lý, khí hậu khác nhau, mỗi địa phương khác nhau dẫn đến tỷ lệ phân lập vi khuẩn này cũng cao thấp khác nhau (Oliveira *et al.*, 2004; Nedbalcov *et al.*, 2006). Cần nhiều hơn nữa các nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo về sự lưu hành của các serotyp gây bệnh chính trên diện rộng cả nước để từ đó có thể xác định được các serotyp gây bệnh chính tại thực địa, lựa chọn được các serotyp đại diện của vi khuẩn *H. parasuis* phục vụ nghiên cứu nhằm chế tạo các chủng giống gốc để sản xuất vacxin phòng bệnh hiệu quả tại Việt Nam.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy môi trường thạch máu thỏ có khả năng thay thế môi trường thạch máu cừu được sử dụng rộng rãi tại các phòng thí nghiệm trên thế giới trong nghiên cứu phân lập vi khuẩn *H. parasuis*. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng các kỹ thuật phân lập, vị trí lấy mẫu như dịch ngoáy khí quản và phổi cho kết quả phân lập cao đối với vi khuẩn *H. parasuis*. Các chủng phân lập tại các tỉnh Thanh Hóa, Hưng Yên, Hà Nam trong nghiên cứu này đều mang đầy đủ các đặc tính sinh hóa học của loài. Đáng chú ý, kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng serotyp 1, 4, 5 là các serotyp lưu hành phổ biến nhất tại các địa bàn nghiên cứu. Kết quả này sẽ là tiền đề triển khai các nghiên cứu diện rộng tiếp theo về sự lưu hành của các serotyp mới, các serotyp gây bệnh chính, tính mẫn cảm kháng sinh cũng như nghiên cứu lựa chọn các serotyp đại diện quốc gia phục vụ nghiên cứu, chế tạo các chủng gốc để sản xuất vacxin phòng bệnh có hiệu quả nhằm giảm thiệt hại do vi khuẩn *H. parasuis* gây ra trên đàn lợn tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aarestrup F.M., Seyfarth A.M., Angen O. (2004). Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. Veterinary Microbiology, 101: 143-146.

Aiqing J., Ruyue Z., Huiying F., Kaijie Y., Jianmin Z., Yindi X., Guiping W., Ming L. (2017). Development of Serotyp-Specific PCR Assays for Typing of *Haemophilus parasuis* Isolates Circulating in Southern China. J. Clin Microbiol., 55(11): 3249-3257.

Bùi Quang Anh, Hoàng Văn Năm, Văn Đăng Kỳ, Nguyễn Văn Long, Nguyễn Ngọc Tiến, (2008). Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS). Nhà xuất bản Nông Nghiệp, tr. 7-21.

Cai X., Chen H., Blackall P. J., Yin Z., Wang L., Liu Z., Jin M. (2005). Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. Vet Microbiol., 111: 231-6.

Cù Hữu Phú (2011). Nghiên cứu mối liên quan giữa Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn với vi khuẩn gây bệnh kế phát và xác định biện pháp phòng, trị bệnh. Báo cáo khoa học, Viện Thú y Quốc gia.

Howell K. J., Peters S. E., Wang J., Hernandez-Garcia J., Weinert L. A., Luan S. L., Chaudhuri R. R., Aragon V., Williamson S. M., Langford P. R., Rycroft A. N., Tucker A. W. (2015). Development of a multiplex PCR assay for rapid molecular serotyping of *Haemophilus parasuis*. J Clin Microbiol., 53(12): 3812-3821.

Keilstein P., Wuthe H.H., Angen O., Mutters R., Ahrens P. (2001). Phenotypic and gentic characterization of NAD-dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance. Vet Microbiol., 81: 243-255.

Kielstein P., Schimmel D., Hass R. (1985). Serological typing of *Haemophilus parasuis*. Arch Exp Veterinarmed., 39: 944-7.

Kilian M. (1976). A taxonomic study of the genus Haemophilus with the proposal of a new species. J. Gen Microbiol., 93: 9-62.

Little T.W.A. (1970). *Haemophilus parasuis* infection in pigs. Veterinary Record, 87: 399-402

Møller K., Andersen L. V., Christensen G., Kilian M. (1993). Optimalization of the detection of NAD dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. Vet Microbiol., 36: 261-71.

Nedbalcov K., Satran P., Jaglic Z., Ondriasova R., Kucerova Z. (2006). *Haemophilus parasuis* and Glässer's disease in pigs: A review. Veterinarni Medicina, 51(5): 168-179.

Nguyễn Bá Hiên, Huỳnh Thị Mỹ Lệ (2013). Bệnh truyền nhiễm của động vật nuôi và biện pháp