

NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH SINH HỌC CHỦNG VI KHUẨN *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM* GÂY BỆNH SÙNG PHÙ ĐẦU GÀ PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM

Trần Phương Thảo¹, Trịnh Quang Đại¹,
Hoàng Công Thành¹, Vũ Thị Lan Hương², Phạm Thị Nga¹,
Lê Thị Vân¹, Trần Thị Nhuận¹, Nguyễn Việt Không¹

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Avibacterium paragallinarum* (gram âm) gây bệnh sung phù đầu gà đã được công bố ở Việt Nam từ năm 2016. Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn *Av. paragallinarum*, serovar A (chủng ND/H04) đã được nghiên cứu nhằm xác định đặc điểm nhân lên, đặc tính sinh hóa, kháng kháng sinh, cũng như phân tích đặc tính di truyền vùng siêu biến đổi gen HMTp210 so sánh với trình tự gen tương ứng của các chủng đã công bố ở GenBank.

Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng vi khuẩn này có khả năng tăng sinh trên môi trường thạch sô cô la, sô cô la lỏng và casman lỏng có bổ sung các yếu tố tăng sinh (5% FBS và 0,01% NADH). Chủng ND/H04 có tính miễn cảm yếu với các kháng sinh gentamicin, colistin và đề kháng với các kháng sinh amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, erythromycin, ceftriaxone, neomycin, tetracycline, doxycycline, ampicillin, penicillin, kanamycin, streptomycin và ticarcillin/clavulanic acid. Phân tích trình tự vùng siêu biến đổi của gen HMTp210 cho thấy mức tương đồng của gen này của chủng phân lập tại Việt Nam so với gen tương ứng của các chủng phân lập tại Trung Quốc là 100% và có họ hàng gần với các chủng vacxin tham chiếu 0083 và 221. Kết quả nghiên cứu này là dữ liệu cần thiết phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo về *Avibacterium paragallinarum* cũng như việc nghiên cứu sâu hơn về chủng ND/H04 phục vụ phát triển vacxin và chế phẩm sinh học phòng chống bệnh sung phù đầu gà ở Việt Nam.

Từ khóa: *Av. paragallinarum*, infectious coryza, HMTp210.

Study on biological characteristics of *Avibacterium paragallinarum* isolated from chicken in Viet Nam

Tran Phuong Thao, Trinh Quang Dai,
Hoang Cong Thanh, Vu Thi Lan Huong, Pham Thi Nga,
Le Thi Van, Tran Thi Nuan, Nguyen Viet Khong

SUMMARY

Avibacterium paragallinarum (a gram-negative bacterium) caused infectious coryza (IC) in chicken in Viet Nam has been reported since 2016. In this study, 1 *Av. paragallinarum*, serovar A (strain ND/H04) was investigated to determine the biochemical, growth characteristics, antibiotic resistance, as well as genetic characteristic analysis of the hypervariable region in HMTp210 gene of the strain ND/H04 in comparison with the corresponding genetic regions in the GenBank. The studied result showed that the strain ND/H04 could grow up in the chocolate agar medium, chocolate broth and casman broth medium adding 5% of FBS and 0.01% of NADH. The result of sensitive test with antibiotics indicated that the strain ND/H04 was weakly sensitive with gentamicin and colistin but resistant to amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, erythromycin, ceftriaxone, neomycin, tetracycline, doxycycline, ampicillin, penicillin, kanamycin, streptomycin and ticarcillin/clavulanic acid. Molecular analysis of the hypervariable region in HMTp210 gene indicated that this gene similarity level of the strain ND/H04 (isolated in Vietnam) was 100% in comparison with the corresponding gene of the strain ND/H04 (isolated in China) and closely related to the reference vaccine strains: 0083 and 221. This study result is the essential database for the further studies on *Av. paragallinarum* bacteria in general as well as on the strain ND/H04 in particular for the development of vaccines and probiotics to prevent the infectious coryza in chickens in Vietnam.

Keywords: *Av. paragallinarum*, infectious coryza, HMTp210.

¹ Công ty cổ phần thuốc Thú y trung ương 5

² Trung tâm Chẩn đoán Thú y trung ương

I. MỞ ĐẦU

Bệnh sưng phù đầu gà hay còn gọi là sổ mũi truyền nhiễm, là bệnh hô hấp cấp tính đã được nhắc đến từ những năm 1930 (Blackall, 1999). Bệnh do vi khuẩn *Avibacterium paragallinarum* (*Av. paragallinarum*), trước đây gọi là *Haemophilus paragallinarum* gây ra. Ở Việt Nam, bệnh sưng phù đầu gà do *Av. paragallinarum* gây ra đã được ghi nhận (Lê Lập và cs., 2006; Nguyễn Thị Thu Hằng và cs., 2006), tuy nhiên những thông tin khoa học liên quan đến sự lưu hành của chủng, serovar, đặc tính sinh học, đặc tính di truyền,... còn rất hạn chế.

Av. paragallinarum là vi khuẩn gram âm, đa hình thái với dạng trực khuẩn ngắn, cầu trực khuẩn hay dạng sợi; kích thước từ 1 - 3 μm x 0,4 - 0,8 μm ; không di động, hiếu khí. Vi khuẩn được phân loại theo 2 hệ thống Page (Page, 1962) và Kume (Kume và cs., 1983). Theo phân loại Page, *Av. paragallinarum* được phân thành 3 type huyết thanh học (serovar hay serogroup) A, B, C và 3 nhóm này không có miễn dịch chéo hoàn toàn cho nhau. Hệ thống Kume chia thành 9 nhóm huyết thanh (A1-4, B1, C1-4) phù hợp với 3 nhóm A, B và C của Page, cách phân loại này có khả năng định type huyết thanh cho nhiều chủng không phân loại được bằng phản ứng ngưng kết theo Page. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng có sự tương đồng trong cùng serovar theo cách phân loại của Page, nhưng lại khác nhau theo cách phân loại của Kume (Blackall, 1991; Blackall và cs., 1987; Kume và cs., 1980).

Hiện nay, bên cạnh việc sử dụng kháng sinh điều trị khi gà mắc bệnh, biện pháp bảo vệ đàn gia cầm hữu hiệu nhất là sử dụng vaccin. Các vaccin đang lưu hành phổ biến trên thị trường thường bao gồm 2 serovar A và C từ các chủng Bắc Mỹ và châu Âu, kết hợp

với những biến chủng serovar B. Tuy nhiên, một vấn đề đang được quan tâm là hiệu quả giữa “vaccin địa phương” và “vaccin quốc tế”. Một số nhóm nghiên cứu như Bragg và cs. (1996) ở Nam Phi, Terzolo và cs. (1997) ở Argentina đã chỉ ra rằng vaccin thương mại sử dụng các chủng được quốc tế công nhận không thể chống lại các biến thể địa phương của *Av. paragallinarum*. Do đó, thông tin khoa học về các chủng thực địa sẽ góp phần không nhỏ vào việc hạn chế thiệt hại do *Av. paragallinarum* gây ra cũng như sẽ là bước đi quan trọng trong việc phát triển các vaccin phù hợp.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn phân tích 1 chủng vi khuẩn *Av. paragallinarum* về đặc điểm nhân lên, đặc tính sinh hóa, tính kháng kháng sinh, cũng như phân tích đặc tính di truyền vùng siêu biến đổi gen HMTp210, so sánh với trình tự gen tương ứng của các chủng đã công bố trong khu vực và trên thế giới.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung

Đánh giá đặc tính nuôi cấy, đặc tính sinh hóa và đặc tính di truyền của 1 chủng vi khuẩn *Av. paragallinarum* phân lập được từ gà mắc bệnh.

2.2. Nguyên vật liệu

Chủng ND/H04 được phân lập từ mẫu bệnh phẩm tại Nam Định năm 2017.

Chủng tham chiếu *Av. paragallinarum* serovar A, chủng W (ATTC, Code 29975™)

Các trình tự của 11 chủng tham chiếu cho 3 serovar Page, 9 serovar Kume và các chủng thực địa trong nghiên cứu được lấy từ các công bố trên GenBank (bảng 1).

Bảng 1. Danh sách trình tự vùng siêu biến gen HMTp210 các chủng nghiên cứu

GenBank	Chủng	Nguồn gốc	Serovar	GenBank	Chủng	Nguồn gốc	Serovar
KU143735	0083	Mỹ	A, A-1 ^(P,K)	KU167075	F-8	Trung Quốc	A
KU143734	221	Nhật Bản	A, A-1 ^(P,K)	KU167076	Yun	Trung Quốc	A
KU143735	2403	Đức	A, A-2 ^(P,K)	KU167077	Gd1	Trung Quốc	A
KU143737	E-3C	Brazil	A, A-3 ^(P,K)	KU167078	Gd2	Trung Quốc	A
KU143738	HP14	Úc	A, A-4 ^(P,K)	KU167079	Gd3	Trung Quốc	A
KU143739	0222	Mỹ	B, B-1 ^(P,K)	KU167092	Xiao	Trung Quốc	B
KU143740	2671	Đức	B, B-1 ^(P,K)	KU167091	Dal	Trung Quốc	B
KU143741	H-18	Nhật Bản	C, C-1 ^(P,K)	KJ867495	221	Đài Loan	A
KU143742	Modesto	Mỹ	C, C-2 ^(P,K)	KJ867496	H18	Đài Loan	C
KU143743	SA-3	Nam Phi	C, C-3 ^(P,K)	KJ867497	TW94	Đài Loan	C
KU143744	HP60	Úc	C, C-4 ^(P,K)	KJ867498	TW07	Đài Loan	C
KU167070	HP31	Úc	C	KY819139	0083	Costa Rica	A
KU167071	Vh	Mỹ	C	KY819140	H18	Costa Rica	C
KU167072	TW	Đài Loan	C	KY819142	Spross	Costa Rica	B
KU167073	TS	Đài Loan	C	KY229708	Cr16	Costa Rica	A
KU167074	TC	Đài Loan	C				

Ghi chú: (P) hệ thống phân loại Page, (K) hệ thống phân loại Kume

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Nuôi cấy

Chủng nghiên cứu được ria cấy trên môi trường thạch sô cô la được bổ sung 5% FBS và 0,01% NADH; ủ 37°C và 5% CO₂ trong 24-48 giờ. Các khuẩn lạc có hình thái nhỏ và trong suốt.

Vi khuẩn được tăng sinh trên 3 loại môi trường thạch sô cô la (được chuẩn bị từ Blood agar base, Himedia), môi trường sô cô la lỏng (chuẩn bị từ Brain Heart Infusion broth, Himedia) và môi trường casman lỏng (Caskan broth base, Himedia) có bổ sung 5% FBS và 0,01% NADH ở điều kiện 37°C; 5% CO₂ và được thu hoạch sau 24 giờ. Tổng số vi khuẩn *Av. paragallinarum* được định lượng bằng phương pháp đếm số trên thạch sô cô la.

2.3.2. Xác định đặc tính sinh hóa

Đặc tính sinh hóa được xác định theo tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8400-18: 2014 cho vi khuẩn *Av. paragallinarum*. Bao gồm phản ứng lên men đường (manitol, glucose, sucrose và

D-xylose), phản ứng phân giải urea, phản ứng catalase và phản ứng oxydase.

2.3.3. Phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA) và ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI)

Hiệu giá của kháng nguyên vi khuẩn *Av. paragallinarum* được xác định bằng phản ứng HA. Kháng nguyên chủng ND/H04 được gắn với hồng cầu gà-glutaraldehyde (hồng cầu gà 1% được gắn với glutaraldehyde) theo quy trình đã được sử dụng bởi Eaves và cs. (1989). Phản ứng HI được thực hiện với 4 đơn vị HA kháng nguyên chủng ND/H04 và kháng huyết thanh serovar A được sản xuất theo phương pháp gây tối miễn dịch trên thỏ, sử dụng vi khuẩn *Av. paragallinarum* chủng W.

2.3.4. Xác định tính miễn cảm kháng sinh

Tính miễn cảm kháng sinh của vi khuẩn *Av. paragallinarum* chủng ND/H04 được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên thạch sô cô la với 14 loại kháng sinh. Giấy tẩm kháng sinh được cung cấp bởi công ty Nam Khoa (Việt Nam). Độ miễn cảm được đánh giá bằng đường

kính vòng vô khuẩn sau 24-48h giờ nuôi cấy ở 37°C, 5% CO₂ trên thạch sô cô la theo tiêu chuẩn của Viện Tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm (CLSI).

2.3.5. Phản ứng Polymerase chain reaction (PCR)

DNA của vi khuẩn *Av. paragallinarum* được tách chiết từ canh khuẩn bằng kit tách chiết DNA (Intron, Hàn Quốc) theo quy trình của nhà sản xuất. DNA tổng số của vi khuẩn được kiểm tra chất lượng bằng máy Nanodrop.

Phản ứng PCR được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của vi khuẩn *Av. paragallinarum* trong canh

khẩn bằng cặp mồi H.par-uni-F: 5-TGAGGG-TAGTCTTGCACGCGAAT-3' và H.par-uni-R: 5'-CAAGGTATCGATCGTCTCTCTACT-3', sản phẩm có kích thước 500bp (Chen và cs., 1996)

2.3.6. Phản ứng Multiplex PCR

Kỹ thuật Multiplex PCR được sử dụng để xác định serovar của vi khuẩn *Av. paragallinarum* bằng cách khuếch đại vùng siêu biến của gen HMTp210. Bộ mồi đặc hiệu cho các serovar A, B và C tương ứng với hệ thống phân loại huyết thanh học của Page (Sakamoto và cs., 2012), trình tự các mồi được trình bày tại bảng 2.

Bảng 2. Các cặp mồi khuếch đại vùng siêu biến của gen HMTp210

TT	Tên primer	Trình tự (5' – 3')	Sản phẩm
1	H. Par-F	GGCTCACAGCTTTATGCAACGAA	
2	H. Par-serovar A-R	CGCGGGATTGTTGATTTTGT	0,8 kb
3	H. Par-serovar B-R	GGTGAATTTACACACACCAC	1,1 kb
4	H. Par-serovar C-R	TAATTTCTTATTCCCAGCATCAATACCAT	1,6 kb

2.3.7. Giải trình tự và phân tích đặc điểm di truyền

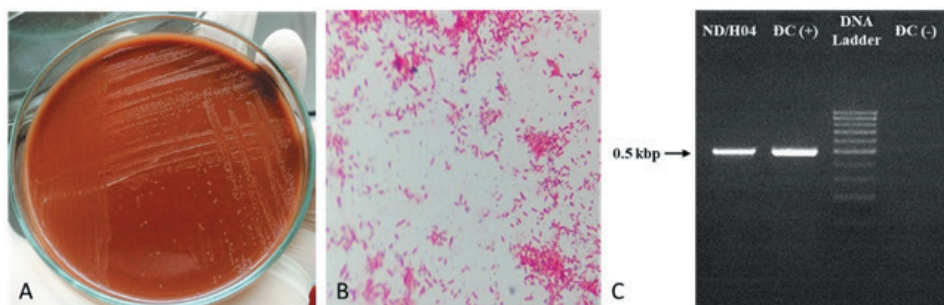
DNA tổng số đã chiết tách được sử dụng làm khuôn để khuếch đại vùng siêu biến của gen HMTp210 của vi khuẩn *Av. paragallinarum* bằng phản ứng PCR. Cặp mồi H.Par-Seq-F: 5'-GATGGCACAATTACATTTACA-3' và H.Par-Seq-R: 5'-ACCTTGAGTGCTAGATGCTGTAGGTGC-3' đặc hiệu cho vùng siêu biến dài 1,6 kb được sử dụng (Sakamoto và cs., 2012). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%, băng có kích thước phù hợp được tinh khiết và giải trình tự. Trình tự được đọc và chỉnh sửa bằng phần mềm DNASTar. Phân tích phả hệ bằng phần mềm Mega (phiên bản 10.1.8) dựa trên phương pháp Maximum likelihood. Độ tin cậy được kiểm tra bằng bootstrap với 1000 lần lặp lại. Phần trăm tương đồng của nucleotide giữa các chủng được tính toán bằng công cụ Sequence Identity Matrix của phần mềm BioEdit (phiên bản 7.2.5).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đã tiến hành phân lập vi khuẩn *Av. paragallinarum* từ các mẫu bệnh phẩm của gà mắc bệnh sung phù đầu từ năm 2017 đến năm 2019. Các chủng phân lập được đánh giá các đặc tính sinh hóa, đặc tính nuôi cấy, định type huyết thanh học và đặc tính di truyền. Trong bài viết này, nhóm tác giả tập trung nghiên cứu, phân tích chủng *Av. paragallinarum* ND/H04 serovar A.

3.1. Đánh giá đặc tính sinh hóa

Khi nuôi cấy chủng ND/H04 trên thạch sô cô la, chúng tôi thu được các khuẩn lạc có hình thái tròn, trơn bóng và không gây dung huyết. Nhuộm gram cho thấy chủng ND/H04 là vi khuẩn gram âm (bắt màu đỏ fucshin), có hình dạng cầu trực khuẩn ngắn giống với các đặc điểm của *Av. paragallinarum* (hình 1A, B) (Akter và cs., 2014). Kết quả giám định bằng phương pháp PCR cho kết quả dương tính cặp mồi phát hiện vi khuẩn *Av. paragallinarum* (hình 1C).



Hình 1. Kết quả giám định vi khuẩn *Av. paragallinarum*
A: Rìa cấy trên thạch sô cô la, B: Nhuộm gram, C: Kết quả PCR

Kiểm tra sinh hóa của chủng ND/H04 cho kết quả âm tính với urea, catalase và oxidase, dương tính với các phản ứng lên men đường manitol, glucose, sucrose và D-xylose. Kết quả trên là hoàn toàn tương đồng với các đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *Av. paragallinarum*.

Các kết quả giám định đặc tính sinh hóa và phản ứng PCR của chủng ND/H04 cho kết quả tương đương với kết quả giám định của vi khuẩn *Av. paragallinarum* chủng W (ATCC, 29975TM).

3.2. Đặc tính nuôi cấy

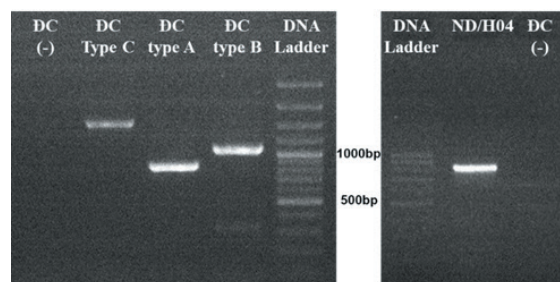
Vi khuẩn phát triển mạnh trên các loại môi trường nuôi cấy có bổ sung các yếu tố phát triển như FBS, NADH trong điều kiện hiếu khí như các nghiên cứu đã công bố trước đây (Akter và cs., 2014; Wahyuni và cs., 2018; Wang và cs., 2014). Sau 24h, ở điều kiện 37°C và 5% CO₂, mật độ vi khuẩn đạt $2,2 \times 10^9$ CFU/ml trên thạch sô cô la, 2×10^8 CFU/ml trên môi trường sô cô la lỏng và thấp nhất ở môi trường casman lỏng ($6,4 \times 10^7$ CFU/ml). Nghiên cứu gần đây cho thấy, một số chủng vi khuẩn *Av. paragallinarum* có thể phân lập trên môi trường thạch máu không cần bổ sung NAD (Lê Văn Hùng và cs., 2019), nhưng chưa có nhiều thông tin với các môi trường dạng lỏng.

Chủng ND/H04 có tính miễn cảm yếu với 2 loại kháng sinh gentamicin, colistin và đề kháng các kháng sinh còn lại như amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, erythromycin, ceftriaxone, neomycin, tetracycline, doxycycline,

ampicillin, penicillin, kanamycin, streptomycin và ticarcillin/clavulanic acid. Trong nghiên cứu gần đây, Lê Văn Hùng và các đồng sự đã thông báo rằng các chủng *Av. paragallinarum* phân lập tại Việt Nam miễn cảm cao với amoxicillin, ampicillin và kháng với gentamicin (Lê Văn Hùng và cs., 2019). Ngoài ra, chúng tôi cũng đánh giá tính miễn cảm với kháng sinh của chủng W, kết quả cho thấy chủng W miễn cảm với tất cả các loại kháng sinh sử dụng. Những kết quả này cho thấy khả năng kháng kháng sinh của các chủng *Av. paragallinarum* phân lập tại Việt Nam.

3.3. Định type huyết thanh (serovar)

Kết quả định type huyết thanh bằng phương pháp Multiplex PCR với chủng ND/H04 cho băng đặc hiệu 0,8 kb của serovar A (hình 2).



Hình 2. Kết quả xác định serotype bằng Multiplex PCR

Kiểm tra bằng phương pháp HI sử dụng huyết thanh đặc hiệu cho serovar A cũng cho kết quả dương tính. Từ những kết quả trên, có thể kết luận chủng ND/H04 trong nghiên cứu này thuộc

serovar A của vi khuẩn *Av. paragallinarum*.

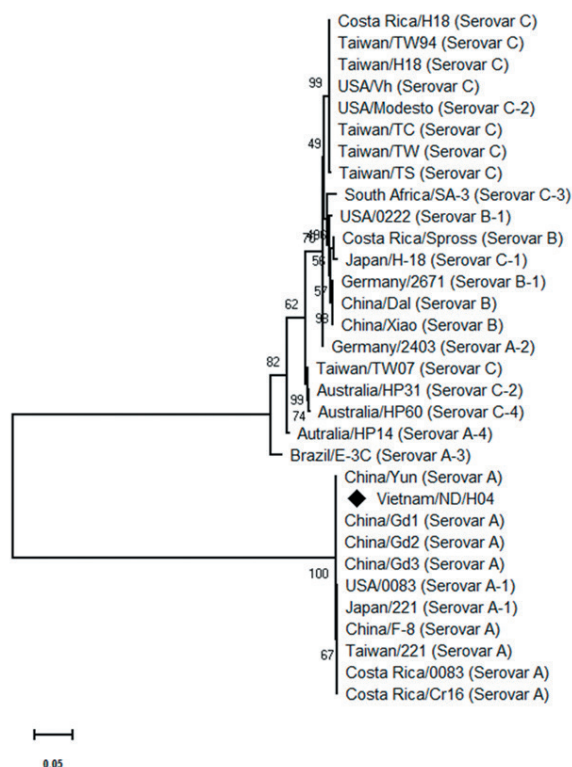
Trong các nghiên cứu đã công bố, phương pháp HI là phương pháp tin cậy để xác định serovar của vi khuẩn *Av. paragallinarum*, tuy nhiên yêu cầu về huyết thanh chuẩn theo hệ thống phân loại của Page (3 serovar) hay Kume (9 serovar) rất khó khăn. Trong khi đó, các phương pháp phân loại nhóm huyết thanh dựa vào kỹ thuật sinh học phân tử như Multiplex PCR, PCR cắt giới hạn hay giải trình tự đang được nhiều nhóm nghiên cứu phát triển. Trong đó, phương pháp Multiplex PCR được nhiều nghiên cứu chứng minh là một phương pháp đáng tin cậy và cho kết quả nhanh hơn phương pháp huyết thanh học (Fedawy và cs., 2016; Patil và cs., 2017).

Trong các nghiên cứu ở các vùng dịch tễ khác nhau trên thế giới, serovar A và serovar C thường là phổ biến nhất. Ở Việt Nam, hai nghiên cứu của Viện Thú y năm 2006 công bố về tỷ lệ nhiễm bệnh do vi khuẩn *Av. paragallinarum* ở khu vực Khánh Hòa, Phú Yên và Quảng Ngãi là 18,39% (theo đàn) và 18,78% (cá thể có triệu chứng). Gà mọi lứa tuổi đều mắc bệnh với thời kỳ ủ bệnh ngắn (24-48 giờ) (Lê Lập và cs., 2006). Serovar của *Av. paragallinarum* gây bệnh ở khu vực miền Trung là 1/7 serovar C và 6/7 serovar A và ở Hà Tây là 9/9 serovar A (Nguyễn Thị Thu Hằng và cs., 2006). Kết quả định type huyết thanh với các chủng phân lập trong nghiên cứu của chúng tôi cũng cho kết quả phổ biến với serovar A và C, như vậy không có sự thay đổi về tỷ lệ serovar từ năm 2006 đến 2019 theo như kết quả nghiên cứu.

3.4. Đặc tính di truyền vùng siêu biến gen HMTp210

Khả năng ngưng kết hồng cầu của vi khuẩn *Av. paragallinarum* đã được chứng minh là được quy định bởi gen HMTp210 và đóng một vai trò thiết yếu trong khả năng gây bệnh của vi khuẩn (Tokunaga, 2005). Gen HMTp210 bao gồm 3 phân vùng, vùng 1 và 3 là những phân vùng có sự bảo tồn cao, vùng 2 là vùng siêu biến đổi (Wu và cs., 2011). Vùng siêu biến của gen

HMTp210 đại diện cho tính kháng nguyên của *Av. paragallinarum*, được đề xuất để sản xuất vaccin tái tổ hợp nhưng những dữ liệu về sự biến đổi di truyền của gen này lại chưa thực sự đầy đủ (Araya-Hidalgo và cs., 2017; Noro và cs., 2007).



Hình 3. Cây phả hệ vùng siêu biến gen HMTp210 của các chủng vi khuẩn *Av. paragallinarum*

Phân tích phả hệ của gen HMTp210 cho thấy chủng ND/H04 nằm về nhánh serovar A có sự tương đồng cao với các chủng Yun, Gd1, Gd2 và Gd3 lưu hành tại Trung Quốc và có họ hàng gần với các chủng vaccin 0083 và 221 (hình 3). Kết quả so sánh trình tự nucleotide và amino acid tại bảng 3 cho thấy, chủng ND/H04 tương đồng cao với các chủng trong cùng nhánh (thấp nhất là 88,50% với nucleotide và 88,00% với amino acid), đặc biệt là các chủng phân lập tại Trung Quốc như Yun, Gd1, Gd2 và Gd3 (100% về cả nucleotide và axit amin). Với các chủng tham chiếu serovar A-1 như USA/0083 và Japan/221 là 99,80% về nucleotide và 99,40%

- 99,60% về amino acid, nhưng với các chủng thuộc serovar A-2, A-3, A-4, B và C khác nhau thì sự tương đồng rất thấp (22,10%-27,00% với nucleotide và 17,70%-25,60% với amino acid). Sự tương đồng thấp giữa serovar A và C đã được mô tả trong nghiên cứu của Wu (18,1%) (Wu và cs., 2011) công bố năm 2011 khi nghiên cứu cấu trúc protein vùng siêu biến giữa chủng 221 (serovar A) và các chủng H18, KA, TW07, ... (serovar C). Điều này cho thấy khả năng bảo hộ chéo của các chủng serotype A, cụ thể là A-1 với các chủng serovar B và C là rất thấp, nhưng

serovar B và C lại có sự bảo hộ chéo với nhau, điều này cũng được Tan và cs. (2020) nhắc đến.

Việt Nam và Trung Quốc có đặc điểm địa lý chung biên giới, hàng năm lượng gia cầm và sản phẩm gia cầm vận chuyển giao thương giữa hai nước là rất lớn. Sự tương đồng giữa chủng ND/H04 với các chủng vi khuẩn *Av. paragallinarum* lưu hành tại Trung Quốc đã cho thấy sự chia sẻ về nguồn lây nhiễm giữa Việt Nam và Trung Quốc. Điều này cho thấy nguy cơ để các dịch bệnh từ Trung Quốc xâm nhập vào trong nước là rất lớn.

STT	Chủng vi khuẩn	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	VietnamND/H04	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	99,60%	99,40%	99,40%	99,40%	88,00%	88,00%	25,40%	23,10%	23,20%	24,70%	25,00%	17,00%	25,20%	25,60%	17,70%	25,60%	24,90%	25,60%	23,10%	23,10%	25,60%	23,10%	25,20%	25,60%	25,40%	25,60%	25,60%	
2	ChinaYun (Serovar A)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	99,60%	99,40%	99,40%	99,40%	88,00%	88,00%	25,40%	23,10%	23,20%	24,70%	25,00%	17,00%	25,20%	25,60%	17,70%	25,60%	24,90%	25,60%	23,10%	23,10%	25,60%	23,10%	25,20%	25,60%	25,40%	25,60%	25,60%	
3	ChinaGd1 (Serovar A)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	99,60%	99,40%	99,40%	99,40%	88,00%	88,00%	25,40%	23,10%	23,20%	24,70%	25,00%	17,00%	25,20%	25,60%	17,70%	25,60%	24,90%	25,60%	23,10%	23,10%	25,60%	23,10%	25,20%	25,60%	25,40%	25,60%	25,60%	
4	ChinaGd2 (Serovar A)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	99,60%	99,40%	99,40%	99,40%	88,00%	88,00%	25,40%	23,10%	23,20%	24,70%	25,00%	17,00%	25,20%	25,60%	17,70%	25,60%	24,90%	25,60%	23,10%	23,10%	25,60%	23,10%	25,20%	25,60%	25,40%	25,60%	25,60%	
5	ChinaGd3 (Serovar A)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	99,60%	99,40%	99,40%	99,40%	88,00%	88,00%	25,40%	23,10%	23,20%	24,70%	25,00%	17,00%	25,20%	25,60%	17,70%	25,60%	24,90%	25,60%	23,10%	23,10%	25,60%	23,10%	25,20%	25,60%	25,40%	25,60%	25,60%	
6	USA0083 (Serovar A-1)	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	88,40%	88,40%	25,40%	23,10%	23,20%	24,70%	25,00%	17,00%	25,20%	25,60%	17,70%	25,60%	24,90%	25,60%	23,10%	23,10%	25,60%	23,10%	25,20%	25,60%	25,40%	25,60%	25,60%	
7	Japan221 (Serovar A-1)	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	100,00%	100,00%	88,60%	88,60%	25,40%	23,10%	23,20%	24,70%	25,00%	17,00%	25,20%	25,60%	17,70%	25,60%	24,90%	25,60%	23,10%	23,10%	25,60%	23,10%	25,20%	25,60%	25,40%	25,60%
8	ChinaF-8 (Serovar A)	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	100,00%	100,00%	88,60%	88,60%	25,40%	23,10%	23,20%	24,70%	25,00%	17,00%	25,20%	25,60%	17,70%	25,60%	24,90%	25,60%	23,10%	23,10%	25,60%	23,10%	25,20%	25,60%	25,40%	25,60%
9	Taiwan221 (Serovar A)	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	99,80%	100,00%	100,00%	88,60%	88,60%	25,40%	23,10%	23,20%	24,70%	25,00%	17,00%	25,20%	25,60%	17,70%	25,60%	24,90%	25,60%	23,10%	23,10%	25,60%	23,10%	25,20%	25,60%	25,40%	25,60%
10	Costa Rica0083 (Serovar A)	88,50%	88,50%	88,50%	88,50%	88,50%	88,50%	88,50%	88,50%	88,60%	88,60%	100,00%	17,90%	15,90%	15,90%	17,10%	17,30%	19,30%	17,70%	18,00%	20,10%	17,70%	17,30%	18,00%	16,10%	17,50%	16,10%	17,70%	15,90%	17,70%	18,00%	17,90%	18,00%
11	Costa RicaCr16 (Serovar A)	88,50%	88,50%	88,50%	88,50%	88,50%	88,50%	88,50%	88,50%	88,60%	88,60%	100,00%	17,90%	15,90%	15,90%	17,10%	17,30%	19,30%	17,70%	18,00%	20,10%	17,70%	17,30%	18,00%	16,10%	17,50%	16,10%	17,70%	15,90%	17,70%	18,00%	17,90%	18,00%
12	Germany2403 (Serovar A-2)	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	19,40%	19,40%	88,20%	88,10%	97,30%	97,30%	86,70%	97,50%	98,20%	88,60%	96,20%	95,20%	98,20%	86,70%	95,60%	86,60%	96,20%	85,10%	97,50%	98,20%	88,10%	98,20%
13	BrazilE-3C (Serovar A-3)	23,00%	23,00%	23,00%	23,00%	23,00%	23,00%	23,00%	23,00%	23,00%	23,00%	18,10%	18,10%	92,70%	92,80%	88,20%	88,90%	78,30%	89,10%	88,40%	79,30%	86,60%	86,30%	88,40%	78,70%	86,30%	76,60%	86,60%	77,30%	88,10%	88,40%	88,20%	88,40%
14	AustraliaHP14 (Serovar A-4)	23,00%	23,00%	23,00%	23,00%	23,00%	23,00%	23,00%	23,00%	23,00%	23,00%	18,20%	18,20%	92,90%	95,90%	85,80%	86,20%	76,20%	86,40%	86,90%	77,70%	85,20%	84,30%	86,90%	85,20%	84,70%	85,00%	85,20%	83,60%	86,40%	86,90%	86,70%	86,90%
15	USA0222 (Serovar B-1)	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	19,60%	19,60%	98,30%	92,60%	91,30%	97,30%	88,00%	97,50%	96,70%	87,10%	94,80%	96,90%	96,70%	84,60%	96,30%	84,50%	94,80%	83,10%	97,50%	96,70%	96,70%	96,70%
16	Germany2671 (Serovar B-1)	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	19,40%	19,40%	98,70%	93,30%	91,90%	96,60%	87,80%	98,80%	97,10%	87,60%	95,10%	96,20%	97,10%	84,60%	95,40%	84,50%	95,10%	83,10%	98,80%	97,10%	96,90%	97,10%
17	Costa RicaSpross (Serovar B)	22,10%	22,10%	22,10%	22,10%	22,10%	22,10%	22,10%	22,10%	22,10%	22,10%	21,40%	21,40%	88,70%	83,20%	81,90%	98,60%	89,30%	87,80%	86,10%	95,30%	84,40%	89,10%	86,10%	75,10%	87,20%	84,00%	84,40%	72,70%	87,60%	86,10%	85,90%	86,10%
18	ChinaDel (Serovar B)	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	19,40%	19,40%	98,70%	93,30%	91,90%	96,70%	99,90%	89,30%	97,30%	87,60%	95,30%	96,30%	97,30%	84,80%	95,60%	84,60%	95,30%	83,20%	100,00%	97,30%	97,10%	97,30%
19	USAVN (Serovar C)	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	19,50%	19,50%	99,10%	92,40%	92,30%	97,80%	96,30%	86,20%	96,30%	90,30%	97,90%	94,60%	100,00%	85,50%	96,50%	85,30%	97,90%	83,90%	97,30%	100,00%	99,80%	100,00%
20	Costa RicaH16 (Serovar C)	22,10%	22,10%	22,10%	22,10%	22,10%	22,10%	22,10%	22,10%	22,10%	22,10%	21,30%	21,30%	88,70%	83,20%	83,00%	88,40%	89,00%	97,30%	89,00%	96,60%	88,40%	85,00%	90,30%	76,60%	87,10%	76,50%	88,40%	75,20%	87,60%	90,30%	90,10%	90,30%
21	TaiwanH18 (Serovar C)	24,00%	24,00%	24,00%	24,00%	24,00%	24,00%	24,00%	24,00%	24,00%	24,00%	19,10%	19,10%	97,10%	96,00%	95,80%	95,80%	96,30%	86,40%	96,40%	98,00%	88,80%	92,70%	97,90%	83,90%	94,60%	83,70%	100,00%	95,80%	95,30%	97,90%	97,70%	97,90%
22	JapanH18 (Serovar C-1)	24,20%	24,20%	24,20%	24,20%	24,20%	24,20%	24,20%	24,20%	24,20%	24,20%	19,50%	19,50%	97,70%	96,00%	95,80%	95,80%	88,20%	90,10%	88,30%	97,20%	87,80%	95,20%	94,60%	82,80%	96,00%	82,70%	92,70%	81,30%	96,30%	94,60%	94,50%	94,60%
23	USAModelsto (Serovar C-2)	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	19,50%	19,50%	99,10%	92,40%	92,30%	97,80%	96,30%	86,20%	96,30%	90,30%	97,90%	94,60%	100,00%	85,50%	96,50%	85,30%	97,90%	83,90%	97,30%	100,00%	99,80%	100,00%
24	AustraliaHP31 (Serovar C-3)	27,00%	27,00%	27,00%	27,00%	27,00%	27,00%	27,00%	27,00%	27,00%	27,00%	22,00%	22,00%	89,30%	83,60%	87,30%	87,30%	88,20%	79,00%	88,30%	88,70%	80,10%	87,10%	87,30%	88,70%	83,30%	96,60%	83,90%	97,90%	84,00%	85,50%	85,30%	85,50%
25	South AfricaSA-3 (Serovar C-3)	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	19,60%	19,60%	97,60%	91,70%	90,80%	96,30%	87,70%	89,10%	87,70%	87,70%	88,40%	95,80%	96,30%	97,70%	87,20%	83,10%	94,60%	87,10%	95,60%	95,50%	96,40%	95,50%
26	AustraliaHP40 (Serovar C-4)	27,00%	27,00%	27,00%	27,00%	27,00%	27,00%	27,00%	27,00%	27,00%	27,00%	22,00%	22,00%	89,20%	83,60%	87,20%	87,80%	88,10%	78,90%	88,20%	88,60%	80,00%	87,00%	87,20%	88,60%	99,80%	87,20%	83,70%	97,60%	84,60%	85,30%	85,20%	85,30%
27	TaiwanTW94 (Serovar C)	24,00%	24,00%	24,00%	24,00%	24,00%	24,00%	24,00%	24,00%	24,00%	24,00%	19,10%	19,10%	97,10%	96,00%	95,80%	95,80%	96,30%	86,40%	96,40%	98,00%	88,80%	100,00%	95,20%	98,00%	87,10%	95,80%	87,00%	88,80%	95,30%	97,90%	97,70%	97,90%
28	TaiwanTW07 (Serovar C)	26,60%	26,60%	26,60%	26,60%	26,60%	26,60%	26,60%	26,60%	26,60%	26,60%	21,80%	21,80%	87,60%	82,10%	85,70%	86,20%	86,60%	77,50%	86,60%	87,10%	78,60%	88,90%	85,70%	87,10%	88,00%	85,60%	87,90%	89,90%	83,20%	83,90%	83,70%	83,90%
29	ChinaXiao (Serovar C)	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	19,40%	19,40%	98,70%	93,30%	91,90%	96,70%	99,90%	89,30%	97,30%	87,60%	95,30%	96,30%	97,30%	84,80%	95,60%	84,60%	95,30%	83,20%	100,00%	97,30%	97,10%	97,30%
30	TaiwanTC (Serovar C)	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	19,50%	19,50%	99,10%	92,40%	92,30%	97,80%	96,30%	86,20%	96,30%	90,30%	97,90%	94,60%	100,00%	85,50%	96,50%	85,30%	97,90%	83,90%	97,30%	100,00%	99,80%	100,00%
31	TaiwanTS (Serovar C)	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	24,30%	19,40%	19,40%	98,70%	93,30%	92,30%	97,70%	88,20%	88,00%	88,20%	99,80%	90,40%	97,80%	97,00%	99,80%	88,60%	97,80%	88,50%	97,80%	90,20%	99,80%	99,80%	
32	TaiwanTW (Serovar C)	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	24,40%	19,50%	19,50%	99,10%	92,40%	92,30%	97,80%	96,30%	86,20%	96,30%	90,30%	97,90%	94,60%	100,00%	85,50%	96,50%	85,30%	97,90%	83,90%	97,30%	100,00%	99,80%	99,80%

Ghi chú: (Phía dưới) tỷ lệ phần trăm tương đồng nucleotide, (phía trên) tỷ lệ phần trăm tương đồng amino acid

Ngoài ra, hai chủng vi khuẩn *Av. paragallinarum* serovar A 221 và 0083 đã được quốc tế công nhận và đang được sử dụng trong việc sản xuất vaccin phòng bệnh do *Av. paragallinarum* gây ra. Trong nghiên cứu này, chủng ND/H04 tương đồng cao với cả 2 chủng vaccin trên; lần lượt là 99,80% nucleotide và 99,40% - 99,60% amino acid. Với sự tương đồng trên, chủng ND/H04 có thể là ứng viên để tiếp tục các nghiên cứu về miễn dịch học, tính ổn định, ... phục vụ cho công tác chẩn đoán cũng

như phát triển các chế phẩm sinh học, vaccin có tính phù hợp cao với thực địa Việt Nam.

IV. KẾT LUẬN

Chủng ND/H04 phát triển tốt trên môi trường sô cô la cả môi trường dạng lỏng và thạch có bổ sung 5% FBS và 0,01% NADH; mang đầy đủ các đặc trưng của vi khuẩn *Av. paragallinarum*. Chủng ND/H04 thuộc serovar A, tương đồng với các chủng lưu hành tại Trung Quốc và có họ hàng gần với các chủng vaccin quốc tế như

0083 và 221. Nghiên cứu đã cho những dữ liệu đầu tiên về đặc tính vi khuẩn học và đặc tính di truyền của vi khuẩn *Av. paragallinarum* chủng ND/H04 lưu hành ở Việt Nam. Đây cũng là cơ sở dữ liệu quan trọng để tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về chủng ND/H04 phục vụ cho việc tạo bộ chủng giống chuẩn cho các nghiên cứu cơ bản cũng như những nghiên cứu ứng dụng trong sản xuất vacxin và các chế phẩm sinh học sau này.

Lời cảm ơn: Cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ kinh phí cho Đề tài thuộc Dự án KH&CN mã số SPQG.05b.05 trong Chương trình phát triển sản phẩm quốc gia đến năm 2020.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akter S. *et al.*, 2014. Isolation and identification of *Avibacterium paragallinarum* from layer chickens in Gazipur, Bangladesh. *Microbes and Health*. 3(1), pp. 9-11.
2. Fedawy Hanaa S. *et al.*, 2016. Phenotypic and genotypic characterization of *Avibacterium paragallinarum* isolated from layer chicken flocks in Egypt yearling 2013-2015. *American Journal of Research Communication*, vol 4(12), pp. 23-34.
3. Lê Lập và cs., 2006. Khảo sát đặc điểm dịch tễ và phân lập *Haemophilus Paragallinarum* gây bệnh phù đầu gà tại 3 tỉnh duyên hải miền Trung. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*. XIII(3), pp. 16 - 23.
4. Lê Văn Hùng, Nguyễn Thị Giang, và Trần Danh Sơn, 2019. Phân lập, xác định đặc điểm của vi khuẩn gây bệnh sổ mũi truyền nhiễm trên gà tại một số tỉnh phía Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 17(8), pp. 622-629.
5. Nguyễn Thị Thu Hằng và Cù Hữu Phú, 2006. Kết quả xác định serotyp của vi khuẩn *Haemophilus paragallinarum* phân lập tại Hà Tây và Khánh Hòa gây bệnh Coryza ở gà. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*. XIII(3), pp. 24 -28.
6. Tan D. H. *et al.*, 2020. Serotypes and hemagglutinin gene sequences of *Avibacterium paragallinarum* isolated in Taiwan. *Avian Diseases*. 64(2), pp. 197-202.
7. Tokunaga Eiji, Sakaguchi, Masashi, Matsuo, Kazuo, Hamada, Fukusaburo, Tokiyoshi, Sachio, 2005. Polypeptide for *Haemophilus paragallinarum* and process for preparing the same. Juridical Foundation The Chemo-Sero Therapeutic Research Institute (Kumamoto-ken, JP), United States.
8. Araya-Hidalgo Edward *et al.*, 2017. Sequence analysis of the hypervariable region in hmt210 of *Avibacterium paragallinarum*. *The Journal of veterinary medical science*. 79(7), pp. 1210-1214.
9. Blackall P. J., 1991. An evaluation of the cross-protection afforded by inactivated infectious coryza vaccines. *Aust Vet J*. 68(8), pp. 266-7.
10. Blackall P. J., 1999. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin Microbiol Rev*. 12(4), pp. 627-32.
11. Blackall P. J. and Reid G. G., 1987. Further efficacy studies on inactivated, aluminum-hydroxide-adsorbed vaccines against infectious coryza. *Avian Dis*. 31(3), pp. 527-32.
12. Bragg R. R., Coetzee L., và Verschoor J. A., 1996. Changes in the incidences of the different serovars of *Haemophilus paragallinarum* in South Africa: a possible explanation for vaccination failures. *Onderstepoort J Vet Res*. 63(3), pp. 217-26.
13. Chen X. *et al.*, 1996. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis*. 40(2), pp. 398-407.
14. Eaves L. E., Rogers D. G. and Blackall P. J., 1989. Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the

- serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinin serovar. *Journal of clinical microbiology*. 27(7), pp. 1510-1513.
15. Kume K. *et al.*, 1983. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *Journal of clinical microbiology*. 17(6), pp. 958-964.
 16. Kume K., Sawata A. and Nakase Y., 1980. Immunologic relationship between Page's and Sawata's serotype strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Am J Vet Res*. 41(5), pp. 757-60.
 17. Noro T. *et al.*, 2007. Identification and expression of a gene encoding an epitope that induces hemagglutination inhibition antibody to *Avibacterium paragallinarum* serovar A. *Avian Dis*. 51(1), pp. 84-9.
 18. Page L. A., 1962. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am J Vet Res*. 23, pp. 85-95.
 19. Patil Vihang Vithalrao, Mishra Debendranath, and Mane Dilip Vithalrao, 2017. 16S ribosomal RNA sequencing and molecular serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolated from Indian field conditions. *Veterinary world*. 10(8), pp. 1004-1007.
 20. Sakamoto R., Kino Y. and Sakaguchi M., 2012. Development of a multiplex PCR and PCR-RFLP method for serotyping of *Avibacterium paragallinarum*. *J Vet Med Sci*. 74(2), pp. 271-3.
 21. Terzolo H. R., Sandoval V. E. and Pondal F. G., 1997. Evaluation of inactivated infectious coryza vaccines in chickens challenged by serovar B strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Pathol*. 26(2), pp. 365-76.
 22. Wahyuni Agnesia Endang Tri Hastuti *et al.*, 2018. Isolation, identification, and serotyping of *Avibacterium paragallinarum* from quails in Indonesia with typical infectious coryza disease symptoms. *Veterinary world*. 11(4), pp. 519-524.
 23. Wang Y. P. *et al.*, 2014. The haemagglutinin of *Avibacterium paragallinarum* is a trimeric autotransporter adhesin that confers haemagglutination, cell adherence and biofilm formation activities. *Vet Microbiol*. 174(3-4), pp. 474-482.
 24. Wu J. R. *et al.*, 2011. Recombinant proteins containing the hypervariable region of the haemagglutinin protect chickens against challenge with *Avibacterium paragallinarum*. *Vaccine*. 29(4), pp. 660-7.
- Ngày nhận 28-10-2020
 Ngày phản biện 3-11-2020
 Ngày đăng 1-1-2021