



NGHIÊN CỨU ĐỘC LỰC CỦA VI KHUẨN *HAEMOPHILUS PARASUIS* BẰNG MÔ HÌNH GÂY NHIỄM TRÊN CHUỘT LANG (GUINEA PIG)

Nguyễn Văn Chèo^{1*}, Zhou Rui², Wang Qiao Na²

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

² Trường Đại học Nông nghiệp Hoa Trung, Hồ Bắc, Trung Quốc

Tóm tắt: Vi khuẩn *Haemophilus parasuis* đã được cấy chuyển qua 250 đời ở hai điều kiện nhiệt độ, nhằm giảm độc lực với hy vọng chọn được chủng có độc lực phù hợp làm nguyên liệu để sản xuất vaccine nhược độc. Các chủng H₃₇₋₁₀₀, H₃₇₋₁₅₀, H₃₇₋₂₀₀, H₃₇₋₂₅₀ và H₄₀₋₁₀₀, H₄₀₋₁₅₀, H₄₀₋₂₀₀, H₄₀₋₂₅₀ là các thể hệ được cấy truyền từ vi khuẩn *Haemophilus parasuis* serotype 5 chủng SH0165 ở điều kiện nuôi cấy 37 °C và 40 °C đã được sử dụng để gây nhiễm cho chuột lang. Liều gây nhiễm sử dụng là liều LD₁₀₀ (5 × 10⁹ CFU/ml) đối với vi khuẩn *Haemophilus parasuis* serotype 5 chủng SH0165. Thí nghiệm được tiến hành nhằm đánh giá độc lực của các chủng vi khuẩn nghiên cứu thông qua các chỉ tiêu về tỷ lệ chết của chuột thí nghiệm theo thời gian, bệnh tích, tỷ lệ mẫu mô phân lập được vi khuẩn sau khi mổ khám. Kết quả cho thấy tỷ lệ chuột thí nghiệm chết trước 24 giờ có xu hướng giảm từ thể hệ 100 - 250 ở cả hai nhóm 37 °C và 40 °C. Bệnh tích và triệu chứng của chuột thí nghiệm rất điển hình của bệnh Glasser, sốt cao, ủ rũ, bỏ ăn, viêm to huyết, các cơ quan có sợi viêm dạng to huyết bao phủ. Tỷ lệ các mẫu phân lập được vi khuẩn sau khi mổ khám cũng cho thấy độc lực của vi khuẩn đã giảm khá rõ rệt. Các cơ quan của những chuột không chết sau thời gian gây nhiễm vẫn phân lập được vi khuẩn *H. parasuis*. Như vậy, độc lực của các chủng vi khuẩn tiếp đời có xu hướng giảm khi các thể hệ tiếp đời tăng lên.

Từ khóa: chuột lang, gây nhiễm, vi khuẩn, *H. parasuis*

1 Đặt vấn đề

Haemophilus parasuis là vi khuẩn Gram âm thuộc họ Pasteurellaceae là nguyên nhân gây nên bệnh Glasser ở lợn. Bệnh này có những triệu chứng điển hình như sinh màng nhầy, nhiều to huyết, viêm đường hô hấp và viêm màng não [1]. Bệnh do *H. parasuis* cũng có những triệu chứng khác như viêm phổi, lợn bị chết đột ngột, tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ chết cao, có khi tỷ lệ chết lên đến 64,00 % [8 - 9]. *H. parasuis* là một trong những vi khuẩn xuất hiện sớm ở đường hô hấp của lợn con, nó cũng có thể được phân lập từ đường hô hấp của những con lợn khỏe mạnh [7,10]. Vi khuẩn này thường được phân lập từ mô phổi, đường hô hấp trên của lợn, ngay cả mô não cũng có thể phân lập được vi khuẩn. Đã có 15 chủng *H. parasuis* được xác định bằng các biện pháp định danh truyền thống.

Một số chủng trong 15 chủng đã được định danh bằng phương pháp phân tử và một số đã được giải trình tự toàn bộ genome như chủng SH0165 [15], ER - 6P (serovar 15) and Nagasaki (serotype 5), 12939 (serotype 1), SW140 (serotype 2), 29755 (serotype 5), MN - H (serotype 13), 84 - 15995 (serotype 15), SW114 (serotype 3), H465 (serotype 11), D74 (serotype 9), and 174 (serotype 7) [3]. Tuy nhiên những chủng này có độc lực rất cao vì vậy không thể dùng

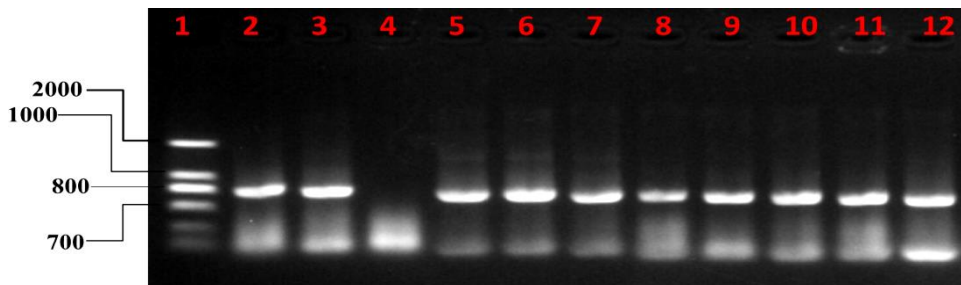
* Liên hệ: chaonguyenvan27@gmail.com

trực tiếp như là một vaccine nhược độc. Chính vì vậy, việc thử nghiệm các chủng có độc lực thấp hơn ngày càng được quan tâm nghiên cứu. Do những chủng đã được tiêm truyền qua động vật hoặc cấy chuyển nhiều đời lại mang lại sự đột biến tự nhiên rất nhanh; vì vậy, việc đánh giá độc lực của các chủng này là rất cần thiết để đạt mục đích sử dụng làm nguyên liệu sản xuất vaccine phòng bệnh.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn *Haemophilus parasuis* sử dụng trong nghiên cứu bao gồm chủng SH0165 serotype 5 được phân lập từ lợn bị bệnh tại Trung Quốc hiện được lưu giữ trong phòng thí nghiệm vi sinh vật Nông nghiệp Trường Đại học Nông nghiệp Hoa Trung; các chủng H₃₇₋₁₀₀, H₃₇₋₁₅₀, H₃₇₋₂₀₀, H₃₇₋₂₅₀ là các thể hệ được tiếp đời từ chủng gốc SH0165 ở điều kiện nuôi cấy 37 °C; H₄₀₋₁₀₀, H₄₀₋₁₅₀, H₄₀₋₂₀₀, H₄₀₋₂₅₀ là các thể hệ được tiếp đời từ chủng gốc SH0165 ở điều kiện nuôi cấy 40 °C. Trước khi tiến hành thí nghiệm tất cả các chủng vi khuẩn này được khẳng định bằng phương pháp PCR với cặp mồi 16S *rRnA*-F 5'GGC TTC GTC ACC CTC TGT AT- 3'; 16S *rRnA*-R 5' GTG ATG AGG AAG GTT GGT GT-3' khuếch đại gen 16S *rRNA* để khẳng định đây là các chủng vi khuẩn *H. parasuis* (hình 1).



Hình 1. Kết quả kiểm tra gene 16S *rRnA* của các chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu (1Marker; 2,3SH0165; 4Đối chứng âm; 5H₃₇₋₁₀₀, 6H₃₇₋₁₅₀, 7H₃₇₋₂₀₀, 8H₃₇₋₂₅₀; 9H₄₀₋₁₀₀, 10H₄₀₋₁₅₀, 11H₄₀₋₂₀₀, 12H₄₀₋₂₅₀)

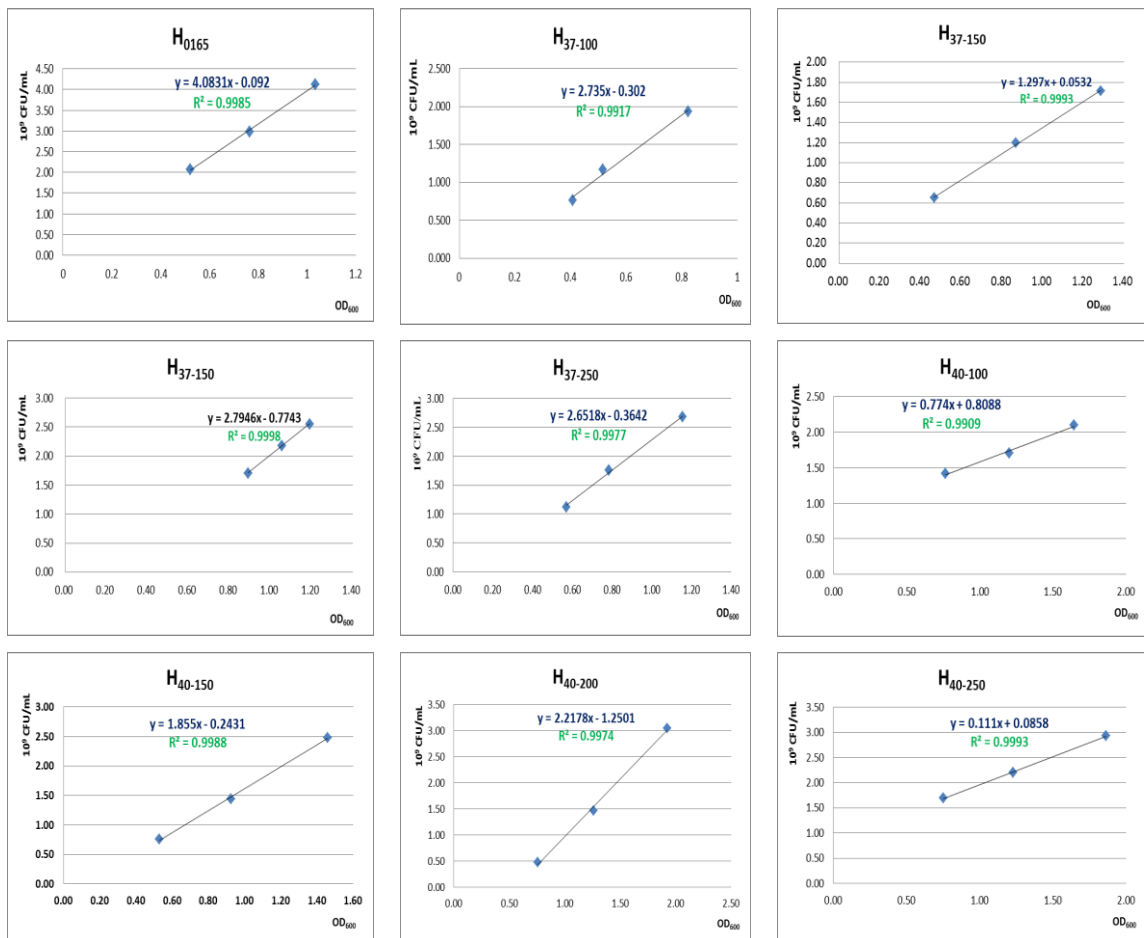
2.2 Xây dựng đường cong sinh trưởng và đường chuẩn của vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu

Đường cong sinh trưởng được xây dựng để đánh giá thời gian và tốc độ sinh trưởng của các chủng vi khuẩn. Đường chuẩn của các chủng vi khuẩn này đã được xây dựng để ứng dụng trong xác định số lượng tế bào vi khuẩn thông qua đo giá trị OD₆₀₀. Các phương trình tương quan (biểu đồ 1) được sử dụng tương ứng với các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này.

Vi khuẩn trước khi thí nghiệm được tái huyền phù từ mẫu bảo quản ở -80 °C trên môi trường TSA (Tryptic Soy Agar do Difco Laboratories, Detroit, MI cung cấp) được bổ sung 10 mg/ml nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) và 5 % huyết thanh bò, nuôi ở 37 °C và 40 °C tương ứng với điều kiện phân lập trước đó của mỗi chủng. Sau 20 giờ đến 24 giờ vi khuẩn tiếp tục được cấy chuyển sang môi trường BHI cũng được bổ sung NAD (10 mg/ml) và 5 % huyết

thanh bào, nuôi ở 37 °C và 40 °C với điều kiện tương ứng, có lắc với tốc độ 175 vòng/phút, 5 % CO₂. Sau 16 giờ đến 18 giờ tiếp tục chuyển sang môi trường BHI với dung tích lớn hơn (30 ml/bình), tại đây huyền phù vi khuẩn được đo OD₆₀₀ 1 giờ một lần, đo đến khi đường cong sinh trưởng đạt đỉnh thì dừng lại (tùy thuộc vào tốc độ sinh trưởng của từng chủng). Đường cong sinh trưởng được xây dựng dựa trên tương quan giữa giá trị OD₆₀₀ và thời gian sinh trưởng.

Đường chuẩn được xây dựng dựa trên kết quả xác định đường cong sinh trưởng, bằng cách chọn ra trên đường cong sinh trưởng giai đoạn sinh trưởng nhanh nhất (log phase) để xác định tương quan giữa số lượng vi khuẩn sống (CFU/ml) và giá trị OD₆₀₀ phương pháp được mô tả bởi [6]. Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường BHI thể tích nuôi 30 ml, giá trị OD₆₀₀ được đo mỗi giờ 1 lần, dựa trên đường cong sinh trưởng chọn thời điểm thích hợp cho mỗi chủng để lấy mẫu xác định số lượng tế bào sống (CFU/ml). Phương pháp xác định số lượng tế bào sống (CFU/ml): lấy 100 µl mẫu canh khuẩn, pha loãng thành dãy nồng độ từ 10⁻¹ đến 10⁻⁹, chọn ba nồng độ (10⁻⁷ - 10⁻⁹) liên tiếp cấy trải trên môi trường TSA, sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp. Số lượng khuẩn lạc được đếm sau 24 h nuôi cấy để tính số CFU/ml [6].



Biểu đồ 1. Đường chuẩn của các chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu

2.3 Thí nghiệm đánh giá độc lực của các chủng vi khuẩn trên chuột lang

Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường BHI để đạt giá trị OD thích hợp cho mỗi chủng. Huyền phù vi khuẩn được ly tâm ở 5000 vòng/phút để thu sinh khối sau đó tái huyền phù bằng nước sinh lý sao cho mật độ tế bào đạt 5×10^9 CFU/ml, đem tiêm cho chuột với liều 2 ml/con, mỗi chủng tiêm cho 5 con chuột. Mật độ tế bào 5×10^9 CFU/ml là liều LD₁₀₀ cho vi khuẩn *H. parasuis* serotype 5 chủng SH0165, liều này đã được khẳng định là liều LD₁₀₀ ở các thí nghiệm trước đây. Số lượng tế bào sống CFU/ml được xác định tùy thuộc vào mức độ sinh trưởng của từng chủng. Khi giá trị OD₆₅₀ đạt mức cần thiết (nằm trong giá trị đường chuẩn được lựa chọn). Số lượng tế bào sống (CFU/ml) trong liều gây nhiễm được đảm bảo bằng cách làm giàu (ly tâm với lượng lớn) sau đó được tái huyền phù với nước sinh lý.

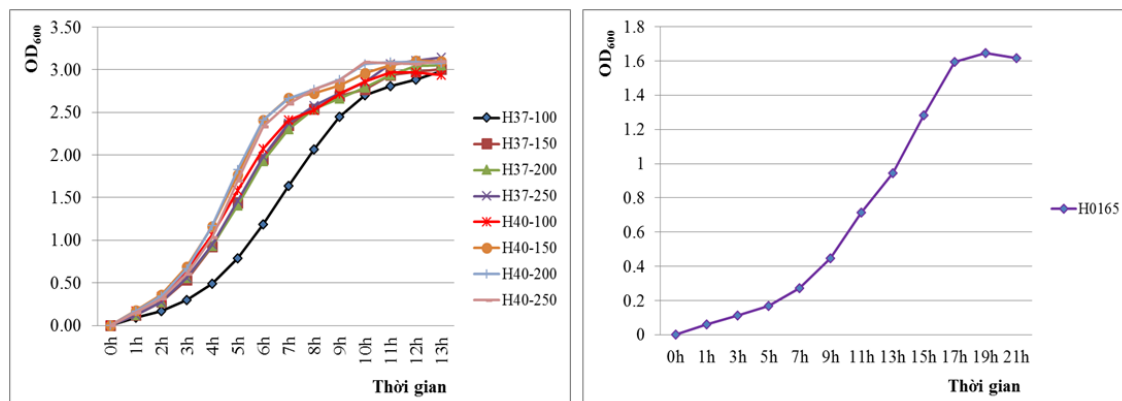
Chuồng nuôi và chế độ chăm sóc: chuột được nuôi ở các ô chuồng riêng biệt được đặt ở các phòng khác nhau cho mỗi nhóm thí nghiệm. Chuột được cho ăn bằng thức ăn chế biến sẵn đảm bảo vô trùng mỗi ngày 3 lần, hệ thống nước uống cung cấp tự động từ bể nước phía trên; chuồng thường xuyên được vệ sinh và khử trùng. Chuột được chọn thí nghiệm là chuột lang đực có trọng lượng trung bình 300 g/con đến 320 g/con. Chuột được nuôi thích nghi trước khi gây nhiễm 7 ngày. Trước khi thí nghiệm phải đảm bảo chuột hoàn toàn khỏe mạnh không có triệu chứng bất thường.

Theo dõi triệu chứng của chuột sau khi gây nhiễm: chuột sẽ được theo dõi ghi nhận triệu chứng 2 giờ một lần, ghi nhận chiều chúng và thời gian chết. Chuột chết sẽ được mổ khám chụp ảnh bệnh tích, lấy mẫu (não, phổi, tim, gan và lách) để phân lập vi khuẩn. Môi trường TSA đã được sử dụng để phân lập lại vi khuẩn từ các mẫu bệnh phẩm. Chuột sẽ được theo dõi trong 72 giờ sau khi gây nhiễm, sau 72 giờ những con không chết cũng sẽ được mổ để kiểm tra bệnh tích và lấy mẫu phân lập lại vi khuẩn. Phương pháp phân lập vi khuẩn từ các mẫu bệnh phẩm: mẫu bệnh phẩm được lấy toàn bộ cơ quan (gan, lách, phổi và não), dùng kéo cắt nhỏ sau đó cho vào ống 50 ml có chứa sẵn viên bi thủy tinh và 20 ml nước sinh lý đã được hấp khử trùng. Các ống sau đó được đưa vào máy lắc với tốc độ 300 vòng/phút trong 5 phút đến 10 phút (tùy đặc tính của từng mô) khi mô được trộn đều, từ các ống mẫu này lấy ra 100 µl pha loãng thành các dãy nồng độ (10^{-1} đến 10^{-5}) (giai đoạn này được lặp lại 3 lần/1 mẫu), từ dãy nồng độ này lấy ra 100 µl cấy trải trên môi trường TSA để xác định sự hiện diện của vi khuẩn gây bệnh. Vi khuẩn sau khi phân lập được khẳng định lại bằng phương pháp PCR. Cặp mồi 16S *rRnA*-F 5'GGC TTC GTC ACC CTC TGT AT- 3' và 16S *rRnA*-R 5' GTG ATG AGG AAG GTT GGT GT - 3' đặc hiệu cho vi khuẩn *H. parasuis* cũng đã được sử dụng để khẳng định lại kết quả phân lập. Kết quả chỉ được ghi nhận là dương tính khi kết quả PCR là dương tính.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả xác định đường cong sinh trưởng của các chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu

Kết quả xác định đường cong sinh trưởng của các chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện ở biểu đồ 2.



Biểu đồ 2. Đường cong sinh trưởng của các chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu

Biểu đồ 2 cho thấy tốc độ sinh trưởng của các thể hệ tiếp đời có xu hướng chậm hơn so với chủng gốc (*H. parasuis* serotype 5 chủng SH0165). Trong khi các chủng tiếp đời chỉ cần khoảng 12 đến 13 giờ là đạt đỉnh của đường cong (phát triển thành số lượng tối đa) sau đó duy trì ở pha ổn định. Chủng SH0165 có tốc độ sinh trưởng chậm hơn so với các chủng tiếp đời, chủng này cần khoảng 19 đến 22 giờ để đạt đến mức độ sinh trưởng tối đa. So sánh giá trị tương quan giữa OD₆₀₀ và thời gian sinh trưởng giữa các chủng tiếp đời cũng cho thấy giá trị OD₆₀₀ của chủng H37-100 có xu hướng thấp hơn so với các chủng khác. Kết quả này phù hợp với kết quả của Gliniewicz và cộng sự [5] khi đánh giá đường cong sinh trưởng của các chủng vi khuẩn *Flavobacterium psychrophilum* đã được tiếp đời (20 lần đến 50 lần) trong môi trường có sự hiện diện của rifampicin. Kết quả nghiên cứu của Gliniewicz và cộng sự (2015) cho thấy, tốc độ sinh trưởng của chủng bố mẹ chậm hơn so với các chủng được tiếp đời từ chủng bố mẹ [5].

3.2 Tỷ lệ chuột thí nghiệm chết theo thời gian

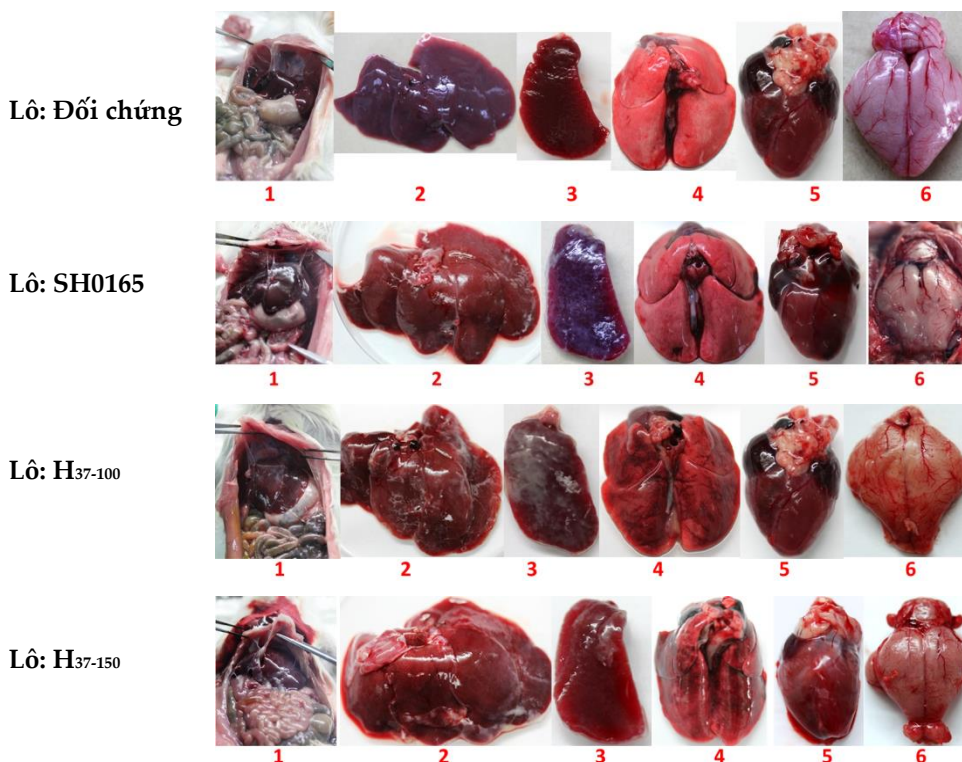
Chuột ở các lô thí nghiệm được tiêm một liều tương ứng với liều LD₁₀₀ của chủng gốc SH0165 (5×10^9 CFU/ml), mỗi con được tiêm 2 ml canh khuẩn. Kết quả theo dõi thời gian gây chết chuột được thể hiện ở bảng 1. Kết quả ở bảng 1 cho thấy, ở chủng vi khuẩn gốc (SH0165), thể hệ H100 tiếp đời, ở cả hai điều kiện nhiệt độ 37 °C và 40 °C đều có độc lực rất cao. Độc lực của chủng này trong cả hai điều kiện đều tương đương độc lực của chủng gốc SH0165. Trong khi vi khuẩn *H. parasuis* serotype 5 chủng SH0165 đã được khẳng định là chủng có độc lực cao [15] thì ở nhóm H37-100 và H40-100 cũng có độc lực cao tương tự như chủng gốc (5/5 con chết trước 48 h sau khi tiêm). Tuy nhiên, đến các thể hệ 150, 200 và 250 độc lực có xu hướng giảm xuống, tỷ lệ chết ở nhóm H37-150 và H40-150 là 80,00 % (4/5); đến nhóm tiếp theo H37-200, H40-250 tỷ lệ chết giảm xuống 20,00 % (1/5). Từ kết quả này có thể thấy rằng độc lực của các chủng tiếp đời từ chủng SH0165 có xu hướng giảm xuống theo các thế hệ nuôi cấy ở các hai điều kiện 37 °C và 40 °C. Vi khuẩn tiếp đời giảm độc lực đã được nghiên cứu và ứng dụng trực tiếp như một loại vaccine giảm độc lực. Một số nghiên cứu cũng giải thích được nguyên nhân dẫn đến sự giảm độc lực của các chủng tiếp đời trong một số điều kiện nhất định [4-5,12,14].

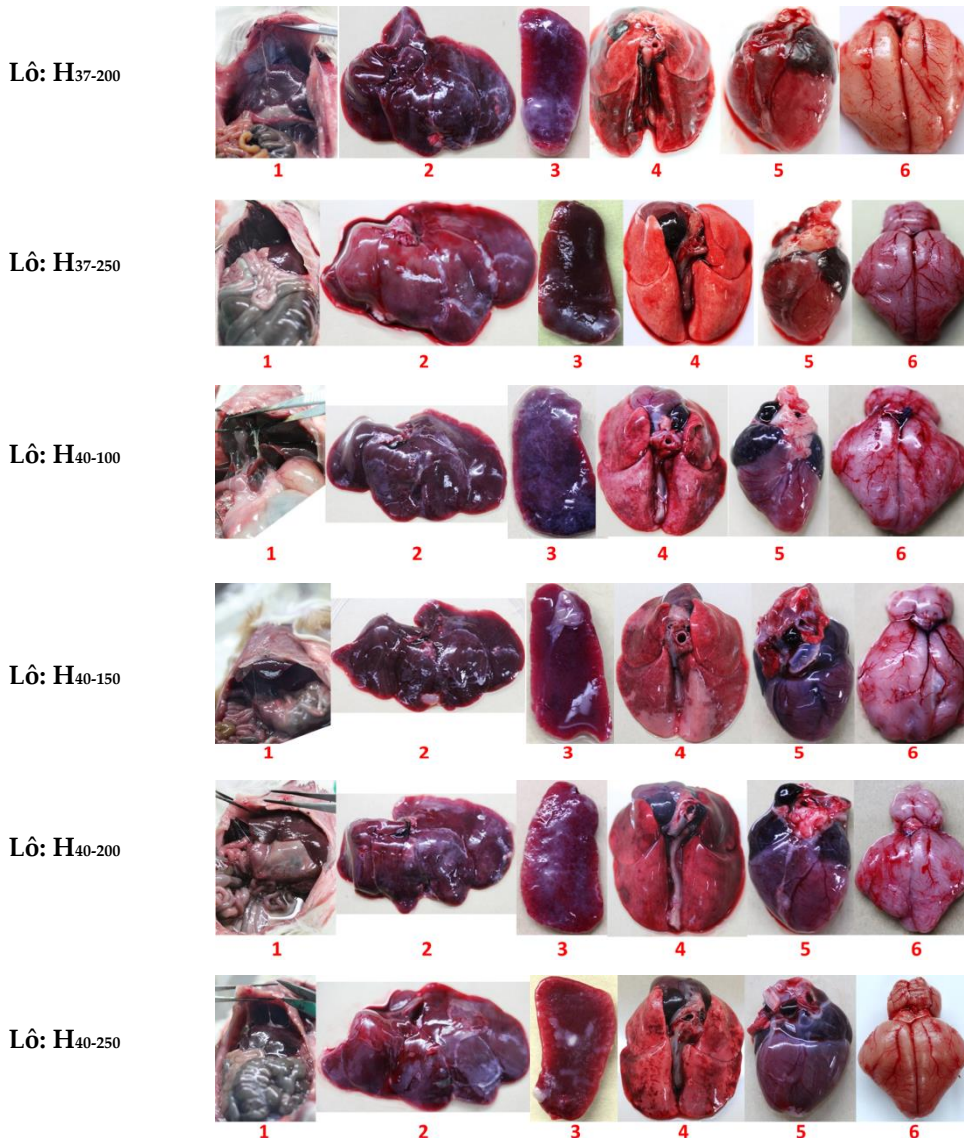
Bảng 1. Số chuột thí nghiệm chết sau khi gây nhiễm

Lô thí nghiệm	Số chuột chết trước 12 h (con)	Số chuột chết trước 24 h (con)	Số chuột chết trước 36 h (con)	Số chuột chết trước 48 h (con)	Số chuột chết trước 60 h (con)	Số chuột chết trước 72 h (con)	Tỷ lệ chuột chết trước 72 h (%)
SH0165	0	2	3	5	5	5	100,0
H37-100	0	1	4	4	5	5	100,0
H37-150	0	2	3	4	4	4	80,00
H37-200	0	1	1	1	1	1	20,00
H37-250	0	2	2	2	2	2	40,00
Đối chứng	0	0	0	0	0	0	0,00
H40-100	0	1	4	5	5	5	100,0
H40-150	0	2	4	4	4	4	80,00
H40-200	0	0	2	3	3	3	60,00
H40-250	0	0	1	1	1	1	20,00

3.3 Bệnh tích và kết quả phân lập vi khuẩn *H. parasuis* từ các mẫu bệnh phẩm

Bệnh tích của chuột ở các lô thí nghiệm được thể hiện ở hình 2.





Hình 2. Bệnh tích điển hình trên một số cơ quan của chuột thí nghiệm 1: Xoang bụng; 2: Gan; 3: Lách; 4: Phổi; 5: Tim; 6: Não

Qua kết quả trên có thể thấy bệnh tích của chuột ở các lô thí nghiệm khá điển hình của bệnh Glasser. Với bệnh tích viêm dính ở xoang bụng và xoang ngực của chuột. Gan và lách có nhiều vùng viêm dính tạo màng giả, phổi có nhiều đốm đen khi nhìn từ bề mặt. Đặc biệt, bệnh tích điển hình nhất là sự xuất hiện màng viêm dính trên các cơ quan nội tạng và tạo ra các sợi tơ huyết trên các bề mặt và các xoang trong cơ thể. Ngoài những bệnh tích điển hình quan sát được, trong quá trình thí nghiệm các triệu chứng bệnh của chuột thí nghiệm như mệt mỏi, bỏ ăn, thở khó, sốt cao... cũng đã được ghi nhận. Như vậy, có thể khẳng định chuột thí nghiệm

chết là do sự tác động của độc tố của vi khuẩn sử dụng gây nhiễm. Những triệu chứng và bệnh tích điển hình quan sát được cũng tương đồng với các kết quả nghiên cứu trước đây [2,11,13].

Chuột chết trước 72 giờ và không chết trong thời gian thí nghiệm được mổ khám và lấy mẫu để phân lập lại vi khuẩn *H. parasuis*. Kết quả cho thấy, tỷ lệ mẫu dương tính với vi khuẩn *H. parasuis* thay đổi ở các mô khác nhau (bảng 1). Tỷ lệ phân lập được vi khuẩn ở các mô phổi và não rất cao. Ở các lô thí nghiệm H₃₇₋₂₀₀; H₃₇₋₂₅₀; H₄₀₋₂₅₀ phân lập được vi khuẩn ở những chuột không chết sau 72 giờ theo dõi. Ở hai lô thí nghiệm H₄₀₋₁₀₀ và H₄₀₋₁₅₀ tất cả các mẫu mô đều phân lập được vi khuẩn *H. parasuis*. Với những con chuột chết, việc phân lập được vi khuẩn ở các mô có thể coi là bình thường vì do tác động của vi khuẩn làm sinh bệnh và là nguyên nhân trực tiếp làm chuột chết. Ngược lại, ở những con chuột không chết vẫn phân lập được vi khuẩn, điều này lại có ý nghĩa rất lớn trong quá trình sinh đáp ứng miễn dịch cho cơ thể. Việc duy trì số lượng nhất định trong thời gian nhất định sẽ giúp cơ thể có cơ hội tiếp xúc với mầm bệnh để kích thích sinh miễn dịch. Tuy nhiên, nếu mầm bệnh tồn tại quá lâu trong cơ thể sẽ có nguy cơ đào thải thường xuyên ra môi trường và gây bệnh, nhưng khi đã được khẳng định là chúng vi khuẩn giảm độc lực thì việc này cũng không đáng lo ngại.

Bảng 2. Kết quả phân lập vi khuẩn *H. parasuis* từ các mẫu bệnh phẩm của chuột thí nghiệm

Lô thí nghiệm	Bệnh phẩm			
	Mô tim (mẫu +/mẫu kiểm tra (%))	Mô phổi (mẫu +/mẫu kiểm tra (%))	Mô lách (mẫu +/mẫu kiểm tra (%))	Mô não (mẫu +/mẫu kiểm tra (%))
SH0165	5/5 (100)	4/5 (80,0)	5/5 (100)	5/5 (100)
H ₃₇₋₁₀₀	3/5 (60,0)	5/5 (100)	3/5 (60,0)	4/5 (80,0)
H ₃₇₋₁₅₀	4/5 (80,0)	4/5 (80,0)	4/5 (80,0)	4/5 (80,0)
H ₃₇₋₂₀₀	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
H ₃₇₋₂₅₀	4/5 (80,0)	5/5 (100)	4/5 (80,0)	5/5 (100)
Đối chứng	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)
H ₄₀₋₁₀₀	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
H ₄₀₋₁₅₀	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)
H ₄₀₋₂₀₀	5/5 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	4/5 (80,0)
H ₄₀₋₂₅₀	4/5 (80,0)	4/5 (80,0)	4/5 (80,0)	5/5 (100)

4 Kết luận

Độc lực của các chủng vi khuẩn *H. parasuis* sau khi tiếp đời qua nhiều thế hệ (khoảng 200 đến 250 thế hệ) có xu hướng giảm rõ rệt.

Các thể hệ vi khuẩn thứ 100 độc lực vẫn còn tương đối cao đối với chuột lang (100 % số chuột gây nhiễm chết trước 48 h).

Tốc độ sinh trưởng đạt mức sinh trưởng tối đa của các chủng sau tiếp đòi nhanh hơn so với chủng gốc SH0165.

Chuột lang gây nhiễm có triệu chứng, bệnh tích điển hình của bệnh Glasser.

Tài liệu tham khảo

1. Amano H., Shibata M., Kajio N., Morozumi T. (1996), Pathogenicity of *Haemophilus parasuis* serovars 4 and 5 in contact-exposed pigs, *Journal of veterinary medical science*, 58(6), 559 - 561.
2. Biberstein E. L., Gunnarsson A., Hurvell B. (1977), Cultural and biochemical criteria for the identification of *Haemophilus* spp from swine, *American Journal of Veterinary Research*, 38(1), 7 - 11.
3. Brockmeier S. L., Register K. B., Kuehn J. S., Nicholson T. L., Loving C. L., Bayles D. O., Shore S. M., Phillips G. J. (2014), Virulence and draft genome sequence overview of multiple strains of the swine pathogen *Haemophilus parasuis*, *PLoS One*, 9(8), e103787 (103781 - 103713).
4. Ferguson-Noel N. M., Laibinis V. A., Kleven S. H. (2012), Evaluation of *Mycoplasma gallisepticum* K-strain as a live vaccine in chickens, *Avian Diseases*, 56(1), 44 - 50.
5. Gliniewicz K., Wildung M., Orfe L. H., Wiens G. D., Cain K. D., Lahmers K. K., Snekvik K. R., Call D. R. (2015), Potential mechanisms of attenuation for rifampicin-passaged strains of *Flavobacterium psychrophilum*, *BioMed Central Microbiology*, 15(179), 015 - 0518.
6. Loske A. M., Tello E. M., Vargas S., Rodriguez R. (2014), *Escherichia coli* viability determination using dynamic light scattering: a comparison with standard methods, *Archives of Microbiology*, 196(8), 557 - 563.
7. Moller K., Kilian M. (1990), V factor-dependent members of the family Pasteurellaceae in the porcine upper respiratory tract, *Journal of clinical microbiology*, 28(12), 2711 - 2716.
8. Morozumi T., Nicolet J. (1986), Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains, *Journal of Clinical Microbiology*, 23(1), 138 - 142.
9. Oliveira S., Galina L., Blanco I., Canals A., Pijoan C. (2003), Naturally-farrowed, artificially-reared pigs as an alternative model for experimental infection by *Haemophilus parasuis*, *Canadian journal of veterinary research*, 67(2), 146 - 150.
10. Oliveira S., Pijoan C. (2004), *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control, *Veterinary Microbiology*, 99(1), 1 - 12.
11. Olvera A., Segalés J., Aragón V. (2007), Update on the diagnosis of *Haemophilus parasuis* infection in pigs and novel genotyping methods, *The Veterinary Journal*, 174(3), 522 - 529.
12. Plante K. S., Rossi S. L., Bergren N. A., Seymour R. L., Weaver S. C. (2015), Extended Preclinical Safety, Efficacy and Stability Testing of a Live-attenuated Chikungunya Vaccine Candidate, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), 1 - 19.
13. Riley M. G., Russell E. G., Callinan R. B. (1977), *Haemophilus parasuis* infection in swine, *Journal of The American Veterinary Medical Association*, 171(7), 649 - 651.
14. Sun Y., Liu C. S., Sun L. (2010), Isolation and analysis of the vaccine potential of an attenuated *Edwardsiella tarda* strain, *Vaccine*, 28(38), 6344 - 6350.

15. Yue M., Yang F., Yang J., Bei W., Cai X., Chen L., Dong J., Zhou R., Jin M., Jin Q., Chen H. (2009), Complete genome sequence of *Haemophilus parasuis* SH0165, *Journal of Bacteriology*, 191(4), 1359 - 1360.

VIRULENCE OF *HAEMOPHILUS PARASUIS* SEROVAR 5 SH0165 STRAIN IN GUINEA PIG

Nguyen Van Chao^{1*}, Zhou Rui², Wang Qiao Na²

¹ College of Agriculture and Forestry, Hue University, Vietnam

² Huazhong Agricultural University, Hubei, China

Abstract: A negative bacterium, *Haemophilus parasuis*, was cultivated through 250 passages under two temperature regimes in order to reduce its virulence and find a strain with suitable virulence for live-attenuated vaccine production. In this study, a guinea pig infection model was used to investigate the virulence of the passages of *H. parasuis* serovar 5 SH0165 strain. Two experimental groups were carried out, both with serial passages of *H. parasuis* serovar 5 SH0165 strain, including H₃₇₋₁₀₀, H₃₇₋₁₅₀, H₃₇₋₂₀₀, H₃₇₋₂₅₀ (incubation at 37 °C) and H₄₀₋₁₀₀, H₄₀₋₁₅₀, H₄₀₋₂₀₀, and H₄₀₋₂₅₀ (incubation at 40 °C). The median lethal concentration (LD₁₀₀: 5×10⁹ CFU/ml) was used as injection dose for the experiments. The results showed that the cumulative mortality (%) of the pigs decreased from H₁₀₀ to H₂₅₀ in both experimental groups during the first 24 hours after infection. Moreover, the typical clinical signs and changes of the infected tissues of Glasser's disease were found in the experimental pigs such as fever, respiratory infections, polyserositis, meningitis, and arthritis. Additionally, *H. parasuis* was reisolated and identified from the survived pigs. In conclusion, the virulence of the passages of *H. parasuis* serovar 5 SH0165 strain was inversely related to the passage time.

Keywords: guinea pig, infection, bacterium, *H. parasuis*