

PHÂN BỐ CÁC SEROTYPE VÀ GENE ĐỘC TỐ CỦA VI KHUẨN *GLAESSERELLA PARASUIS* PHÂN LẬP TỪ VIỆT NAM VÀ TRUNG QUỐC

Tóm tắt

Glaesserella parasuis (*G. parasuis*) “trước đây có tên là *Haemophilus parasuis*” là vi khuẩn thường trú ở đường hô hấp của lợn, vi khuẩn này là nguyên nhân gây bệnh Glasser với các đặc điểm viêm khớp, viêm màng giả và viêm màng não. Bệnh Glasser là một trong những nguyên nhân chính làm tăng tỷ lệ chết ở lợn con, và làm giảm hiệu quả kinh tế trong chăn nuôi lợn. Trong nghiên cứu này, các serotype và chín gene độc tố (VG) của 400 chủng *G. parasuis* phân lập từ mẫu thực địa đã được lần lượt phân tích bằng phương pháp one-step multiplex PCR (mPCR), và phương pháp PCR. Tương quan giữa serotype và gene độc tố cũng đã được phân tích. Kết quả cho thấy, các serotype phổ biến ở tất cả các chủng là serotype 5/12, 4, 1, và 6. Có sự khác nhau về sự phân bố các serotype 1, 2 và 10 giữa chủng phân lập ở Việt Nam và ở Trung Quốc ($p < 0,05$). Đa số các chủng *G. parasuis* mang ít nhất 1 trong 9 gene độc tố của vi khuẩn này, trong khi đó chỉ có 16/400 chủng không mang VG. Trong đó tỷ lệ các chủng mang gene *vta1* (91,3%) là cao nhất, tiếp đến là các gene *vta3* (86,5%), *vta2* (82,5%), và *wza* (68,0%). Một số mối tương quan thuận giữa serotype và VG cũng đã được phát hiện, trong đó có tương quan giữa serotype 1 với các gene *wza*, *HPM-1373*, *vta2*, *vta3*; giữa serotype 5 với các gene *lgsB*, *capD*, *HPM-1371*, *HPM-1372*; giữa serotype 6 với gene *vta2*; và giữa serotype 7 với các gene *wza*, *HPM-1371*, *HPM-1372*. Sự phân bố các gene độc tố ở chủng có độc lực cao cũng cao hơn so với các chủng có độc lực trung bình và độc lực thấp. Kết quả của đề tài này cho thấy sự đa dạng của các serotype và các VG của các chủng *G. parasuis* phân lập được. Hơn nữa, nghiên cứu cũng cung cấp những thông tin quan trọng, làm cơ sở cho việc lựa chọn hoặc phát triển các loại vaccine phù hợp để kiểm soát bệnh Glasser ở Việt Nam và Trung Quốc.

Từ khóa: *G. parasuis*, Serotypes, VG, Việt Nam, Trung Quốc

Distribution of virulence-associated genes and their associations with serotypes of *glaesserella parasuis* isolates from vietnam and china

Summary

Glaesserella parasuis “resently still known as *Haemophilus parasuis*” is a common opportunistic pathogen known for its ability to colonize in healthy pigs and causes Glässer’s disease with characterized fibrinous polyserositis, arthritis and meningitis. Glasser’s disease is one of the major causes of high mortality rates in piglets, resulting in significant economic losses to the swine production worldwide. In this study, the serotypes and nine known virulence-associated genes (VGs) of 400 *G. parasuis* field strain were identified by one-step multiplex PCR (mPCR), and PCR method, respectively. The correlations between serotypes and VGs were analysis. The results showed that the most prevalent serotypes were 5/12, 4, 1, and 6 for all the strains. However, difference was observed between Chinese isolates and Vietnamese isolates in which the dominant serotypes were 5/12, 4, and 1 for the Chinese strains and 5/12, 2 and 4 for the Vietnamese ones. The prevalence of serotypes 1, 2, 10, and non-typeable were significantly different between Chinese and Vietnamese strains ($p < 0.05$). Most strains carried at least one of the nine tested VGs, while only 16 strains did not carry any of the VGs. The *vta1* (91.3%) was the most frequently detected VG, followed by *vta3* (86.5%), *vta2* (82.5%), and *wza* (68.0%). Several positive associations between serotypes and VGs were observed, which were between serotype 1 and *wza*, *HPM-1373*, *vta2*, and *vta3*; serotype 5 and *lgsB*, *capD*, *HPM-1371*, and *HPM-1372*; serotype 6 and *vta2*; and serotype 7 and *wza*, *HPM-1371*, and *HPM-1372*. The prevalent of VGs was significantly higher among strains belonging to the highly virulent group than those belonging to the moderately and non-virulent groups. The results in this study confirmed the diversity and prevalence of serotypes and VGs in *G.*

parasuis field strains. This is important for developing vaccine candidates allowing for the control of Glässer's disease in China and Vietnam.

Keyword: *G. parasuis*, Serotypes, VG, Vietnam, China

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới, Việt Nam và Trung Quốc là những quốc gia đứng đầu về chăn nuôi lợn, trong đó Trung Quốc đứng đầu về sản xuất thịt lợn tiếp theo đó là Hoa Kỳ, Brazil, Tây Ban Nha và Việt Nam (FAO, 2018). *Glaesserella parasuis* là nguyên nhân gây ra bệnh Glasser ở lợn với các triệu chứng và bệnh tích điển hình viêm đa xoang, viêm đa khớp và viêm màng não (Bouchet và cs., 2008; Nedbalcová và Kučerová, 2013; Oliveira and Pijoan, 2004). Vi khuẩn này thường được phân lập từ đường hô hấp trên của lợn khỏe mạnh và lợn ốm (Cai và cs., 2005; Cu và cs., 2005; Galofré-Milà và cs., 2017; Van và cs., 2019; Zhang và cs., 2012; Zhang và cs., 2019). Cho đến nay, đã có hơn 15 serotype của vi khuẩn này được xác định bằng nhiều phương pháp khác nhau (Van và cs., 2019; Zhang và cs., 2019). Một phương pháp phân tử được gọi là one-step multiplex PCR để phân loại serotype của vi khuẩn *G. parasuis* đã được phát triển bởi Howell và cs., (2015); phương pháp này cho phép định danh các serotype nhanh hơn, nhạy hơn và chính xác hơn các phương pháp truyền thống. Trong 15 serotype của vi khuẩn *G. parasuis*, thì các chủng thuộc serotype 1, 5, 10, 12, 13, và 14 được dự đoán là các chủng có độc lực cao, các chủng thuộc serotype 2, 4, và 15 là các chủng có độc lực trung bình, và các chủng thuộc serotype 3, 6, 7, 8, 9, và 11 là các chủng độc lực thấp (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992; Oliveira and Pijoan, 2004).

Một số gene độc tố (VG) của vi khuẩn *G. parasuis* mã hóa các yếu tố độc lực đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây (Galofré-Milà và cs., 2017; Lawrence và Bey, 2015; Martínez-Moliner và cs., 2012; Pina và cs., 2009). Trong đó, các gen *HPM-1371*, *HPM-1372*, *HPM-1373* mã hóa cho các glycosyltransferase, *vta1*, *vta2* và *vta3* mã hóa các protein vận chuyển qua màng, và *lsgB*, *capD* và *wza* mã hóa cho các sialyltransferase, protein sinh tổng hợp polysaccharide (Lawrence và Bey, 2015; Wang và cs., 2013; Xu và cs., 2013; Zhou và cs., 2012). Hầu hết các VG này đã được xác định trong các serotype độc lực cao hoặc các serotype phổ biến của vi khuẩn *G. parasuis* (Lawrence và Bey, 2015; Martínez-Moliner và cs., 2012; Wang và cs., 2013). Việc phân tích các VG, các serotype và các mối tương quan giữa chúng có thể hữu ích trong việc tiên đoán độc lực của vi khuẩn này. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn còn ít các nghiên cứu mô tả mối tương quan giữa VG và các serotype của *G. parasuis*. Trong nghiên cứu của Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992), việc phân chia các serotype thành các nhóm độc lực chỉ được căn cứ vào nghiên cứu thực địa mà chưa có căn cứ vào phân tích kiểu gene.

Theo hiểu biết của chúng tôi, vắc xin phòng bệnh Glasser vẫn chưa được phát triển và sử dụng ở Việt Nam. Sự đa dạng về serotype, các gene độc tố và tỷ lệ cao của các chủng không định danh được serotype đã cản trở sự phát triển của vắc xin hiệu quả chống lại bệnh này (Oliveira và Pijoan, 2002). Do đó, hiểu được sự đa dạng của các serotype và kiểu gen (đặc biệt là các VG) ở *G. parasuis* sẽ hữu ích cho việc phát triển các loại vắc xin phòng bệnh Glasser. Mối tương quan giữa các serotype và VG đã được nghiên cứu đối với các chủng *G. parasuis* phân lập từ Việt Nam trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Van và cs. 2019). Tuy nhiên vẫn còn thiếu các dữ liệu để mở rộng các phân tích tương quan giữa VG và các serotype. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân tích sự phổ biến của các serotype và VG, cũng như mối liên hệ của chúng với số mẫu lớn hơn, bao gồm 344 chủng phân lập từ Trung Quốc và 56 chủng phân lập từ Việt Nam. Với mong muốn cung cấp đủ căn cứ để có thể dự đoán được độc lực của các chủng vi khuẩn phân lập được dựa vào phân tích các serotype. Ngoài ra, đề tài cũng có thể cung cấp được sự đa dạng và sự khác nhau về phân bố các serotype, kiểu gene độc tố giữa các chủng được phân lập từ hai nước là Việt Nam và Trung Quốc.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn và tách chiết DNA

Nghiên cứu này sử dụng 400 chủng *G. parasuis* phân lập từ thực địa, trong đó 56 chủng phân lập từ lợn ở miền Trung Việt Nam vào năm 2017 (Van và cs., 2019), và 344 chủng từ Trung tâm chẩn đoán bệnh động vật của Đại học Nông nghiệp Hoa Trung, Vũ Hán, Trung Quốc, được thu thập từ năm 2008 đến năm 2018. Vi khuẩn *G. parasuis* được nuôi cấy trên thạch tryptic soy agar (TSA, BD Difco™, BD Biosciences, Hoa Kỳ) và môi trường brain heart infusion (BHI, BD Difco™, BD Biosciences, Hoa Kỳ) có bổ sung 10 µg/mL nicotinamide adenine dinucleotide (NAD, Sigma-Aldrich, Ins., USA) và 5% huyết thanh bò. Các chủng *G. parasuis* được định danh bằng phương pháp PCR để khuếch đại gen 16S rRNA sau đó được giải trình tự theo mô tả của Oliveira cs., (2001). gDNA tổng số của các chủng vi khuẩn *G. parasuis* được tách chiết bằng cách sử dụng Bacterial DNA Kit (Cat # D3350, Omega bio-Tek Inc., USA). Nồng độ gDNA tổng số được đo bằng hệ thống NanodropND2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., UK).

2.2. Phương pháp định danh các serotype

Tất cả các chủng đều được phân tích serotype bằng phương pháp one-step multiplex PCR (mPCR), như đã mô tả trước đây của Howell và cs., (2015). Danh sách môi, kích thước sản phẩm và serotype đích được thể hiện ở bảng 1. Hỗn hợp phản ứng mPCR chứa 12,5 µL 2 × Es Taq MasterMix (CW Biotech Co., Ltd., Bắc Kinh, Trung Quốc), 0,25 µL DMSO, 3 µL hỗn hợp môi (50 µmol/L), 7,25 µL nước cất và 2 µL gDNA (nồng độ > 10 ng/µL), thể tích cuối cùng của phản ứng là 25 µL. Chu trình nhiệt của phản ứng mPCR gồm 5 phút ở 94 °C, tiếp theo là 35 chu kỳ: 30 giây ở 94 °C, 30 giây ở 58 °C và 1 phút ở 68 °C, sau đó ủ ở 68 °C trong 5 phút. Tất cả các sản phẩm của mPCR được phân tích bằng điện di với gel agarose 2%.

Bảng 1: Trình tự đoạn môi và kích thước sản phẩm của mPCR

Gen	Trình tự đoạn môi (3'-----> 5')	Serotype đích	Kích thước sản phẩm (bp)
<i>funB</i>	F - CTGTGTATAATCTATCCCCGATCATCAGC R - GTCCAACAGAATTTGGACCAATTCCTG	1	180
<i>wzx</i>	F - CTAACAAGTTAGGTATGGAGGTTTTGGTG R - GGCACCTGAATAAGGGATAATTGTAAGT	2	295
<i>glyC</i>	F - CATGGTGTATTATCCTGACTGGCTGT R - TCCACATGAGGCCGCTTCTAATATACT	3	610
<i>wciP</i>	F - GGTAAAGAGGTAGAGCTAAGAATAGAGG R - CTTTCCACAACAGCTCTAGAAACC	4	320
<i>wcwK</i>	F - CCACTGGATAGAGAGTGGCAGG R - CCATACATCTGAATTCCTAAGC	5/12	450
<i>gltI</i>	F - GATTCTGATGATTTTTGGCTGACGGAACG R - CCTATTCTGTCTATAAGCATAGACAGGAC	6	360
<i>funQ</i>	F - CTCCGATTTTCATCTTTTCTATGTGG R - CGATAAACATAACAATTCCTGGCAC	7	490
<i>scdA</i>	F - GGAAGGGGATTACTACTACCTGAAAG R - CTCCATAGAACCTGCTGCTTGAG	8	650
<i>funV</i>	F - AGCCACATCAATTTTAGCCTCATCA R - CCTTAAATAGCCTATGTCTGTACC	9	710
<i>funX</i>	F - GGTGACATTTATGGGCGAGTAAGTC R - GCACTGTCATCAATAACAATCTTAAGACG	10	790
<i>amtA</i>	F - CCATCTCTTAACTAATGGGACTG R - GGACGCCAAGGAGTATTATCAAATG	11	890
<i>gltP</i>	F - GCTGGAGGAGTTGAAAGAGTTGTTAC R - CAATCAAATGAAACAACAGGAAGC	13	840
<i>funAB</i>	F - GCTGGTTATGACTATTTCTTTTCGCG R - GCTCCCAAGATTAACCAACAAGCAAG	14	730
<i>funI</i>	F - CAAGTTCGGATTGGGAGCATATATC R - CCTATATCATTTGTTGGATGTACG	15	550
<i>HPS_219690793</i>	F - ACAACCTGCAAGTACTTATCGGGAT R - TAGCCTCCTGTCTGATATTCCCACG	All	275

2.3. Phương pháp phân tích gene độc tố

Đối với phân tích gene độc tố (VG), xét nghiệm PCR đơn mỗi đã được sử dụng theo mô tả trước đây của Lawrence và Bey (2015). Danh sách mỗi, kích thước sản phẩm và serotype đích được thể hiện ở bảng 2. Hỗn hợp PCR (tổng thể tích 25 μ L) bao gồm 12,5 μ L 2 \times Taq PCR master mix (CW Biotech Co., Ltd., Bắc Kinh, Trung Quốc), 2 μ L mỗi mỗi (10 μ mol/L), 7,5 μ L nước cất và 1 μ L gDNA (nồng độ > 10 ng/ μ L). Chu trình nhiệt cho PCR gồm 5 min ở 94 $^{\circ}$ C, tiếp theo là 35 chu kỳ: 30 giây ở 94 $^{\circ}$ C, 30 giây ở 55 $^{\circ}$ C và 1 phút ở 68 $^{\circ}$ C, sau đó ủ ở 72 $^{\circ}$ C trong 5 phút. Tất cả các sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di với gel agarose 1%.

Bảng 2: Trình tự đoạn mỗi và kích thước sản phẩm PCR khuếch đại các gen độc tố

Gen	Mỗi	Trình tự (5'→3')	Kích thước sản phẩm (bp)
<i>lsgB</i>	<i>lsgB</i> -F	ATGAATTTGATTATTTGTATGACTCCATTTC	969
	<i>lsgB</i> -R	CTATTGGCATGTGTAGTCAATTACTTC	
<i>capD</i>	<i>capD</i> -F	ATGTTAATGCCATTAATTTATTCATTG	780
	<i>capD</i> -R	TCCAACCGATAGAACCAGCAGCACCAGTC	
<i>wza</i>	<i>wza</i> -F	ATGTGTAAGTTAACTAAAGCTCTTG	840
	<i>wza</i> -R	AGCAATTGCTTCGGTTAACGTCATAC	
1370	1370-F	ATGCTAAAAAGAGTGTTTGATATTTTC	540
	1370-R	TATATTATGATTAACATAATC	
1371	1371-F	ATGAACTTTCTACCATTTCGCCCTTCCCG	520
	1371-R	ATTATATTTGAATCCAGGTTCAATG	
1372	1372-F	ATGAAATTGTCTGTCTTAATGGCTGT	720
	1372-R	TCCGCCAAATGTACATCATCAC	
1373	1373-F	ATGAAATTGTCTGTCTTAATGGCTGT	462
	1373-R	CTCTCATACCATACCCCAACTCAGG	
<i>vta 1</i>	<i>vta1</i> -F	TTTAGGTAAAGATAAGCAAGGAAATCC	406
	<i>vta1</i> -R	CCACACAAAACCTACCCCTCCTCC	
<i>vta 2</i>	<i>vta2</i> -F	AGCTTATATTCTCAGCACAAGGTGC	294
	<i>vta2</i> -R	CCACTGATAACCTACCCCCACAGAG	
<i>vta 3</i>	<i>vta3</i> -F	AATGGTAGCCAGTTGTATAATGTTGC	293
	<i>vta3</i> -R	CCACTGTAATGCAATACCTGCACC	

2.4. Phân tích số liệu

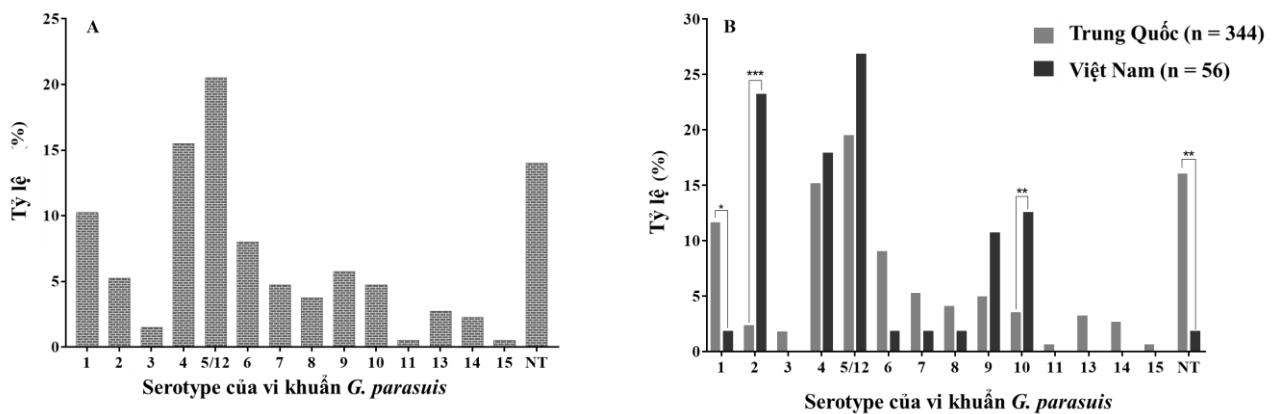
Phần mềm SPSS (IBM SPSS Statistics phiên bản 18.0, IBM, Hoa Kỳ) đã được sử dụng để phân tích thống kê mô tả và so sánh thống kê. Phân tích Chi bình phương được thực hiện trong việc so sánh từng cặp tần số serotype giữa các khu vực nơi mẫu được thu thập và sự phân bố của các VG. Tất cả các thử nghiệm đều được so sánh 2 chiều và giá trị *p* thấp hơn 0,05 được xác định là sai khác có ý nghĩa thống kê. Mỗi tương quan giữa các serotype hoặc nhóm độc lực và VG được phân tích bằng cách sử dụng Chi-square và hàm Fisher. Mỗi tương quan có ý nghĩa thống kê được trình bày dưới dạng tỷ số chênh lệch (OR) với khoảng tin cậy (CI) 95%. Mỗi tương quan được cho là có ý nghĩa thống kê nếu giá trị *p* thấp hơn 0,05.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân bố các serotype của vi khuẩn *G. parasuis*

Kết quả phân tích sự phân bố serotype của các chủng *G. parasuis* được thể hiện trong hình 1. Nhìn chung, serotype được phát hiện thường xuyên nhất là serotype 5/12 (20,5%), tiếp theo là

serotype 4 (15,5%), serotype 1 (10,3%), serotype 6 (8,0%), serotype 9 (5,8%) và serotype 2 (5,3%), trong khi các serotype 3, 11, 13, 14 và 15 chỉ chiếm số ít mẫu, và có 14,0% là các chủng không xác định được serotype (hình 1A). Với các chủng phân lập từ Trung Quốc, serotype 5/12 là phổ biến nhất, tiếp theo là các serotype 4 (15,1%), serotype 1 (11,6%), và các chủng không xác định serotype (16,0%) (hình 1B). Với các chủng phân lập từ Việt Nam, serotype 5/12 là phổ biến nhất (26,8%), tiếp theo là các serotype 2 (23,2%), serotype 4 (17,9%), serotype 10 (12,5%) và serotype 9 (10,7%). Có sự sai khác thống kê ($p < 0,05$) khi so sánh sự phân bố các serotype 1, 2, 10, và nhóm không xác định serotype giữa các chủng phân lập ở Trung Quốc và Việt Nam (hình 1B). Đây là nghiên cứu đầu tiên để so sánh sự phân bố các serotype của vi khuẩn *G. parasuis* phân lập từ Việt Nam và Trung Quốc. Kết quả cho thấy, có sự sai khác về sự phân bố các serotype 1, 2, 10 và các chủng không xác định serotype của vi khuẩn *G. parasuis* phân lập từ Việt Nam và Trung Quốc. Trong khi các serotype 3, 11, 13, 14 và 15 không được phát hiện trong các chủng phân lập ở Việt Nam, và các serotype này cũng được phát hiện ở một số ít các chủng phân lập từ Trung Quốc. Sự khác nhau về phân bố các serotype của vi khuẩn này có thể do thời gian lấy mẫu khác nhau (Rúbies *et al.*, 1999), vùng địa lý khác nhau (Angen *et al.*, 2004; Howell *et al.*, 2017), hoặc do sự khác nhau về phương pháp lấy mẫu và phương pháp phân tích (Jia *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2016). Với tất cả các chủng (gồm cả những chủng phân lập ở Việt Nam và Trung Quốc), các serotype 5, 4, 1 và 2 là những serotype phổ biến nhất, kết quả này cũng tương tự như kết quả của một số nghiên cứu trước đây ((Jia *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2012). Trong nghiên cứu này, có 56/400 (14,0%) chủng là không xác định được serotype (không thuộc 15 serotype đã được định danh trước đây), kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Jia *et al.*, (2017); và Ma *et al.*, (2016). Nguyên nhân của việc không thể xác định được serotype của các chủng này có thể là do chưa hiểu hết về trình tự các vùng đặc hiệu tương đồng cho từng serotype “không có tính đặc hiệu tương đồng với trình tự” được tìm thấy bằng kỹ thuật BLASTN trên ngân hàng gene (Jia *et al.*, 2017). Kết quả từ nghiên cứu này cho thấy, trong số các serotype được phát hiện với tần số cao thì serotype 4 và 5 có tính tương đồng giữa Việt Nam và Trung Quốc, đây là cơ sở quan trọng cho việc phát triển các loại vaccine phòng bệnh Glasser trên lợn ở cả hai quốc gia.



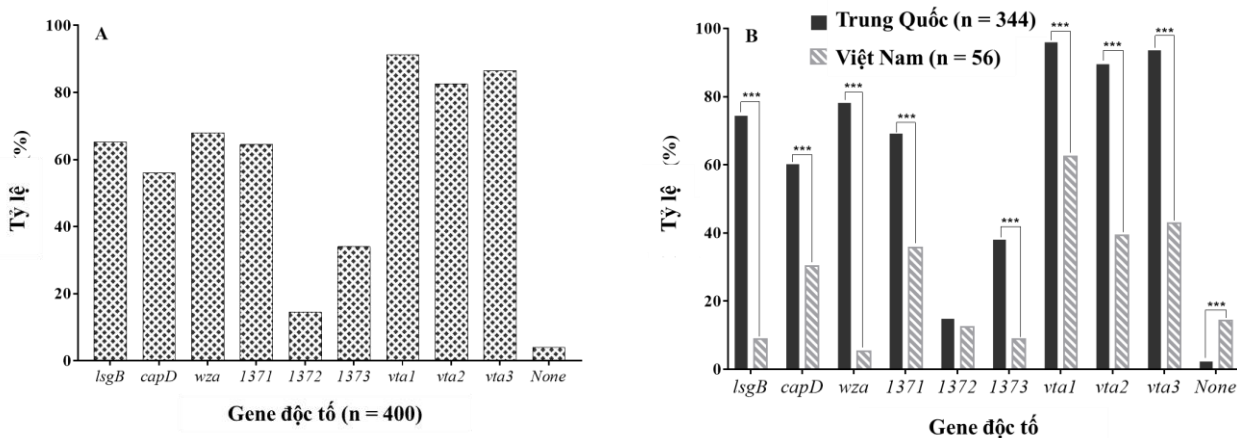
Hình 1. Phân bố các serotypes trong 400 chủng *G. parasuis* phân lập được

Phân bố các serotypes ở tất cả các chủng *G. parasuis* (A), Sự khác nhau phân bố các serotype giữa các chủng phân lập ở Việt Nam và Trung Quốc (B). NT, các chủng không định danh được serotype. Dấu * thể hiện sự sai khác thống kê với * là $p < 0,05$; ** là $p < 0,01$ và *** là $p < 0,001$.

3.2. Phân bố các gene độc tố (VG)

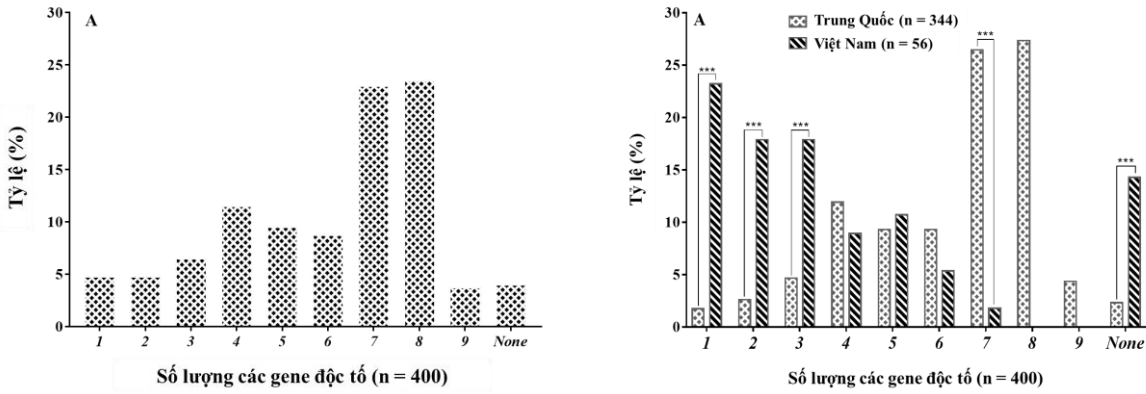
Tần số và phân bố các VG của các chủng *G. parasuis* được trình bày ở hình 2 và hình 3. Với các chủng phân lập ở Trung Quốc, đa số các chủng (95,9%) có mang gene *vta1*, tiếp theo là các gene *vta3* (93,6%), *vta2* (89,5%), và *wza* (78,2%) (hình 2A); trong khi đó số chủng mang gene *HPM-1372* (14,8%) là thấp nhất trong chín gene được phân tích. Trong toàn bộ số chủng (bao gồm cả chủng phân lập ở Việt Nam và ở Trung Quốc), thì *vta1* (91,3%) là gene phổ biến nhất trong các

chúng, tiếp theo là gene *vta3* (86,5%), *vta2* (82,5%), và *wza* (68,0%). Gene *HPM-1372* là gene cũng có tần số thấp nhất (14,5%), và 16 (4,0%) chủng mang gene độc tố nào trong chín gene nghiên cứu (hình 2B). Đa số các chủng (384/400, 96,0%) mang ít nhất từ một đến chín gene nghiên cứu (hình 3A), trong đó có 94/400 (23,5%) số chủng mang tám hoặc chín gene, tiếp theo số chủng mang bảy gene (92/400, 23,0%), và các chủng mang bốn gene (46/400, 11,5%). Kết quả cũng cho thấy sự sai khác có ý nghĩa thống kê về tần số mang các gene độc tố *lgsB*, *capD*, *wza*, *HPM-1371*, *HPM-1373*, *vta1*, *vta2*, và *vta3* giữa các chủng của Việt Nam và Trung Quốc ($p < 0,01$) (hình 2B). Có 15 chủng phân lập từ Trung Quốc mang tất cả các gene độc tố được phân tích, trong đó bảy chủng là serotype 5/12 và những chủng khác thuộc các serotype 1, 4, 6, và serotype 7. Các nghiên cứu trước đây đã khẳng định, 9 gene độc tố này là những gene có vai trò quan trọng trong quá trình gây bệnh của vi khuẩn *G. parasuis* (Bouchet *et al.*, 2008; Galofré-Milà *et al.*, 2017; Hill *et al.*, 2003; Lawrence and Bey, 2015). Trong nghiên cứu này, tất cả các gene độc tố đã được phát hiện trong các chủng *G. parasuis* phân lập được với tần số cao. Trong đó, gene *vta1* (91,2%) xuất hiện với tần số cao nhất, tiếp theo là các gene *vta3* (86,5%), *vta2* (82,5%), *wza* (68,0%), và *lgsB* (65,2%). Đặc biệt có bảy chủng phân lập ở Trung Quốc là serotype 5 mang cả chín gene độc tố. Đa số các gene độc tố, bao gồm *vta1*, *vta3*, *vta2*, *wza*, *HPM-1371*, *lgsB*, và *capD*, được phát hiện ở các chủng được coi là chủng độc lực cao, kết quả này tương đồng với kết quả của một số nghiên cứu trước đây (Martínez-Moliner *et al.*, 2012; Olvera *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2010). Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên đi so sánh sự khác nhau phân bố của các gene độc tố giữa hai quốc gia Việt Nam và Trung Quốc. Kết quả cho thấy sự khác nhau ($p < 0,05$) về tỷ lệ phát hiện các gene độc tố *lgsB*, *capD*, *wza*, *HPM-1371*, *HPM-1373*, *vta1*, *vta2*, và *vta3* giữa các chủng phân lập ở Việt Nam và Trung Quốc. Kết quả cũng cho thấy tần số phân bố các gene độc tố giữa các chủng phân lập ở Việt Nam và Trung Quốc là khác nhau. Những kết quả này là thông tin quan trọng cho việc thiết kế vaccine để phòng bệnh Glasser trên lợn ở vùng địa lý khác nhau.



Hình 2. Tần số phát hiện các gene độc tố (VG) của các chủng *G. parasuis* phân lập được

Tần số phát hiện các gene độc lực trong tất cả các chủng (A), Sự khác nhau phân bố gene độc lực giữa chủng phân lập ở Việt Nam và Trung Quốc (B). Dấu * thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê (***) là $p < 0,001$.



Hình 3. Phân bố các gene độc tố của vi khuẩn *G. parasuis* phân lập được

Phân bố các gene độc tố trong tất cả các chủng (A), sự khác nhau phân bố gene độc tố giữa các chủng phân lập ở Việt Nam và Trung Quốc (B). Dấu * thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê (***) là $p < 0,001$.

3.3. Mối tương quan giữa các serotype và VG

Bảng 3. Phân bố các gene độc tố theo các serotype và theo nhóm độc lực của vi khuẩn *G. parasuis* phân lập được

	Số chủng	Tần số các gene độc tố									
		<i>vta1</i>	<i>vta3</i>	<i>vta2</i>	<i>wza</i>	<i>lgsB</i>	<i>1371</i>	<i>capD</i>	<i>1373</i>	<i>1372</i>	N*
Tổng số	400	365	346	330	272	261	258	224	136	58	16
Serotype 5/12	82	78	73	72	60	63	68	57	26	24	1
Serotype 4	62	60	54	51	37	41	36	36	28	5	1
NT**	56	47	45	40	28	42	33	29	12	10	6
Serotype 1	41	40	40	40	35	31	32	26	22	4	0
Serotype 6	32	31	31	31	24	22	21	20	14	3	1
Serotype 9	23	17	15	14	12	12	12	11	8	1	5
Serotype 2	21	14	14	17	7	6	4	5	3	1	0
Serotype 7	19	18	18	17	18	14	17	14	6	8	0
Serotype 10	19	18	14	12	12	7	11	9	4	1	0
Serotype 8	15	13	14	13	12	3	6	2	3	0	1
Serotype 13	11	10	10	8	9	8	5	6	5	0	1
Serotype 14	9	9	8	7	8	6	6	4	2	0	0
Serotype 3	6	6	6	4	6	2	4	3	2	0	0
Serotype 11	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0
Serotype 15	2	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0
Độc lực cao ^A	162 ^a	155 ^a	145 ^a	139 ^a	124 ^a	115 ^a	122 ^a	102 ^a	59 ^a	29 ^a	2
Độc lực trung bình	100 ^b	89 ^b	84 ^b	83 ^b	58 ^b	52 ^b	48 ^b	44 ^b	34 ^b	6 ^b	2
Độc lực thấp	82 ^b	74 ^b	72 ^b	68 ^b	62 ^b	52 ^b	55 ^b	49 ^b	31 ^b	13 ^b	6

^A Phân loại độc lực của các serotypes theo mô tả của Kielstein and Rapp-Gabrielson (1992); các ký hiệu a, b cho thấy sự sai khác thống kê ($p < 0,05$) của tần số phân bố các VG giữa các nhóm có độc lực khác nhau. N*, chủng không mang gene độc tố, NT**, chủng không định danh được serotype (không thuộc 15 serotype đã được định danh trước đây).

Sự liên kết giữa các serotype và các VG đã được phân tích cho tất cả các chủng *G. parasuis*, kết quả được thể hiện ở các bảng 3 và bảng 4. Đa số các VG phân bố ở các chủng thuộc serotype 5/12, tiếp theo là các chủng thuộc serotype 4, các chủng không định danh được serotype, và chủng thuộc serotype 1. Có 16 chủng không mang bất kỳ VG nào, chúng thuộc về các serotype 4, 5/12, 6, 8, 9 và 13. Tất cả các VG phân bố ở các serotype 1, 2, 4, 5/12, 6, 7, 9, 10 và 11 (bảng 3). Một số mối tương quan dương ($OR > 1$) giữa serotype và VG đã được phát hiện trong nghiên cứu này, trong đó có mối tương quan giữa serotype 1 với *wza* ($OR = 3,0$; $p = 0,01$), *HPM-1373* ($OR = 2,5$; $p = 0,006$), *vta2* ($OR = 9,5$; $p = 0,008$), và *vta3* ($OR = 6,9$; $p = 0,03$); serotype 5 với *lgsB* ($OR = 2,0$; $p = 0,01$), *capD* ($OR = 2,1$; $p < 0,006$), *HPM-1371* ($OR = 3,3$; $p < 0,0001$), và *HPM-1372* ($OR = 4,8$; $p = 0,003$); serotype 6 với *vta2* ($OR =$

7,2; $p = 0,03$); và serotype 7 với *wza* (OR = 9,0; $p = 0,01$), *HPM-1371* (OR = 0,03; $p = 0,03$), và *HPM-1372* (OR = 4,5; $p = 0,006$).

Bảng 4. Tương quan giữa serotype và gene độc tố trong vi khuẩn *G. parasuis*

Serotype	Đặc điểm của chủng vi khuẩn					Tương quan giữa serotype và VG (n=400)		
	n-Ps	VG	n-Pg	S+/G-	S-/G+	OR	95% CI	p
Serotype 1	41	<i>wza</i>	272	6	237	3,0	1,2–7,3	0,01
		<i>1373</i>	136	19	114	2,5	1,3–4,8	0,006
		<i>vta2</i>	330	1	290	9,5	1,3–70,4	0,008
		<i>vta3</i>	346	1	306	6,9	0,9–51,5	0,03
Serotype 2	21	<i>lgsB</i>	261	15	255	0,2	0,1–0,5	< 0,0001
		<i>capD</i>	224	16	219	0,2	0,1–0,6	0,003
		<i>wza</i>	272	14	265	0,2	0,1–0,5	0,001
		<i>1371</i>	258	17	254	0,1	0,03–0,4	< 0,0001
		<i>vta1</i>	365	7	351	0,2	0,06–0,4	0,001
Serotype 5	82	<i>vta3</i>	346	7	332	0,2	0,1–0,7	0,01
		<i>lgsB</i>	261	19	198	2,0	1,1–3,5	0,01
		<i>capD</i>	224	25	167	2,1	1,2–3,5	0,006
		<i>1371</i>	258	14	190	3,3	1,8–6,1	< 0,0001
Serotype 6	32	<i>1372</i>	58	11	50	4,8	1,8–12,6	0,003
		<i>vta2</i>	330	1	299	7,2	0,9–53,3	0,03
Serotype 7	19	<i>wza</i>	272	1	254	9,0	1,2–68,2	0,01
		<i>1371</i>	258	2	241	4,9	1,1–21,7	0,03
		<i>1372</i>	51	10	44	4,5	1,6–12,5	0,006
Serotype 8	15	<i>lgsB</i>	261	12	258	0,1	0,03–0,4	< 0,0001
		<i>capD</i>	224	13	222	0,1	0,02–0,5	0,001
Serotype 9	23	<i>vta1</i>	365	6	348	0,2	0,1–0,6	0,01
		<i>vta2</i>	330	9	316	0,3	0,1–0,7	0,01
Serotype 10	19	<i>lgsB</i>	261	12	254	0,3	0,1–0,8	0,01
		<i>vta2</i>	330	7	318	0,3	0,1–0,9	0,03
NT	56	<i>wza</i>	272	28	244	0,4	0,2–0,7	0,002
		<i>1373</i>	136	44	124	0,4	0,2–0,9	0,03
		<i>vta1</i>	365	9	318	0,4	0,2–0,9	0,04
		<i>vta2</i>	330	16	290	0,5	0,2–0,9	0,02

n-Ps: Số chủng được định danh là serotype tương ứng. *n-Pg*: Số chủng mang gene độc tố tương ứng. *S+/G-*: Số chủng được định danh là serotype tương ứng, nhưng không mang gene độc tố. *S-/G+*: Số chủng không phải là serotype tương ứng, nhưng có mang gene độc tố. *NT*: Chủng không định danh được serotype (không thuộc 15 serotype đã được định danh trước đây)

Mỗi tương quan giữa các VG và các nhóm serotype có độc lực khác nhau cũng đã được phân tích, kết quả được thể hiện ở bảng 3 và bảng 5. Kết quả cho thấy, đa số các VG được phát hiện ở nhóm có độc lực cao. Với các chủng có độc lực cao, có 155/318 (48,7%), 145/301 (48,1%), 139/290 (47,9%), 124/244 (50,8%), 115/219 (52,5%), 122/255 (47,8%), 102/195 (52,3%), 59/124 (47,6%), và 29/48 (60, 4%) chủng là dương tính với các gene độc tố tương ứng *vat1*, *vat2*, và *vta3*, *wza*, *lgsB*, *HPM-1371*, *capD*, *HPM-1373*, và *HPM-1372*. Có sự sai khác về tần số phân bố các VG giữa các chủng có độc lực cao và chủng có độc lực trung bình hoặc độc lực thấp ($p < 0,05$). Tuy nhiên, không có sự sai khác ($p > 0,05$) về tần số phân bố các VG giữa các chủng có độc lực trung bình và chủng độc lực thấp (bảng 3). Các chủng độc lực cao có sự liên kết dương (OR > 1) với các VG gồm *capD* (OR = 1,6; $p = 0,02$), *wza* (OR = 1,9; $p = 0,003$), *HPM-1371* (OR = 2,3; $p < 0,0001$), và *vta1* (OR = 2,9; $p = 0,01$). Một số mối liên kết giữa các chủng độc lực trung bình với các VG cũng đã được phát hiện, tuy nhiên tất cả các mối liên kết này đều là liên kết âm (OR < 1) (bảng 5). Các nghiên cứu trước đây đã dựa vào việc gây nhiễm trên động vật thí nghiệm để phân loại các serotype của vi khuẩn *G. parasuis* vào các nhóm độc lực khác nhau (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992; Sack and Baltés, 2009; Wang *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2010). Trước đây các serotype của vi khuẩn *G. parasuis* đã được phân vào các nhóm độc lực khác nhau (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992; Oliveira and Pijoan, 2004). Tuy nhiên, cách phân loại này mới chỉ dựa và kết quả về kiểm chứng lâm sàng bằng cách dựa vào triệu chứng lâm sàng, biểu hiện bệnh tích

và tái phân lập vi khuẩn *G. parasuis* từ động vật thí nghiệm, nhưng không căn cứ vào kiểu gene độc tố của từng serotype. Trong khi đó các chủng *G. parasuis* thuộc các serotype khác nhau thì có độc lực khác nhau (Van *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2014). Trong nghiên cứu này, tất cả chín gene độc tố không chỉ được phát hiện ở các serotype 1, 5, và 10, mà còn được phát hiện ở các chủng là các serotype 2, 4, và 6. Kết quả cũng cho thấy, có sự tương quan thuận giữa các gene độc tố và các serotype 1 và 5, những serotype này đã được xác định thuộc nhóm độc lực cao. Hơn nữa mối tương quan thuận giữa một số gene độc tố với các serotype 6 và 7 cũng được phát hiện, những serotype này trước đây được xếp vào nhóm độc lực thấp. Như vậy, ngoài việc xếp các serotype vào các nhóm độc lực dựa trên căn cứ nghiên cứu thực chứng lâm sàng, chúng ta cần kết hợp với việc phân tích gene độc tố. Khi kết hợp cả hai phương pháp sẽ cho ra kết quả chính xác hơn. Từ đó sẽ giúp ích rất lớn cho việc xác định được các chủng có nguy cơ gây bệnh và các chủng không có nguy cơ gây bệnh. Đồng thời việc này cũng giúp chúng ta có được định hướng tốt hơn trong công tác phòng và điều trị bệnh Glasser trên lợn.

Bảng 5. Tương quan giữa nhóm độc lực và gene quy định độc tố trong vi khuẩn *G. parasuis*

Nhóm độc lực ^a	Đặc điểm của các chủng					Tương quan giữa nhóm độc lực và VG (n=400)		
	n-Ps	VG	n-Pg	S+/G-	S-/G+	OR	95% CI	p
Nhóm độc lực cao	162	<i>capD</i>	224	60	122	1.6	1.1–2.4	0.02
		<i>wza</i>	272	38	148	1.9	1.3–3.1	0.003
		<i>1371</i>	258	40	136	2.3	1.5–3.6	< 0.0001
		<i>vtaI</i>	365	7	210	2.9	1.3–6.9	0.01
Nhóm độc lực trung bình	100	<i>lgsB</i>	261	48	209	0.5	0.3–0.8	0.002
		<i>capD</i>	224	56	180	0.5	0.3–0.8	0.007
		<i>wza</i>	272	42	214	0.6	0.3–0.9	0.01
		<i>1371</i>	258	52	210	0.4	0.2–0.6	< 0.0001
		<i>1372</i>	58	94	52	0.3	0.1–0.7	0.008

^aSerotype sử dụng phân vào các nhóm độc lực (nhóm độc lực cao gồm các serotype 1, 5, 10, 12, 13 và 14; nhóm độc lực trung bình gồm các serotype 2, 4 và 15; nhóm độc lực thấp gồm các serotype 3, 6, 7, 8, 9 và 11) theo mô tả của Kielstein and Rapp-Gabrielson, (1992). n-Ps: Số chủng là các serotype thuộc nhóm độc lực tương ứng. n-Pg: Số chủng mang gene độc tố tương ứng. S+/G-: Số chủng là các serotype thuộc nhóm độc lực tương ứng, nhưng không mang gene độc tố. S-/G+: Số chủng là các serotype không thuộc nhóm độc lực tương ứng, nhưng mang gene độc tố.

4. KẾT LUẬN

Kết quả của đề tài này cung cấp những thông tin cơ bản về sự phân bố các serotype và gene độc tố của các chủng *G. parasuis* phân lập từ Việt Nam và Trung Quốc. Mối liên kết giữa các serotype và gene độc tố được phát hiện trong nghiên cứu này có thể hữu dụng trong việc hiểu hơn về các đặc điểm của vi khuẩn này. Kết quả này là sự bổ sung quan trọng cho việc xác định độc lực của các chủng *G. parasuis*. Hơn nữa, hiểu được sự đa dạng và tần số phân bố của các serotype và gene độc tố của *G. parasuis* phân lập từ Việt Nam và Trung Quốc sẽ giúp cho việc phát triển vaccine phòng bệnh Glasser trên lợn cho nhiều vùng địa lý khác nhau.

5. LỜI CẢM ƠN

Bài báo này được hỗ trợ bởi Chương trình phát triển các phòng thí nghiệm trọng điểm khu vực của chính phủ Trung Quốc (2017YFD0500201), và dự án phát triển trong lĩnh vực nghiên cứu ứng dụng và nghiên cứu cơ bản của thành phố Vũ Hán (2018020401011300).

6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

Angen, Ø., Svensmark, B., Mittal, K.R., 2004. Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. *Vet. Microbiol.* 103, 255-258.

- Bouchet, B., Vanier, G., Jacques, M., Gottschalk, M., 2008. Interactions of *Haemophilus parasuis* and its LOS with porcine brain microvascular endothelial cells. *Vet. Res.* 39, 42.
- 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, 231-236.
- Cu, H.P., Nguyen, N.N., Nguyen, T.H., Au, X.T., Nguyen, B.T., Vu, N.Q., Pham, B.N., 2005. Determination the causes of respiratory disease in pigs rearing at some different provinces in the North Vietnam. *Vet. Sci. and Tech.* 7, 23-32. In Vietnamese with English abstract.
- FAO, (2018). Food and agricultural Organization statistical, Live animals. FAO, Washinton D.C. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>
- Galofré-Milà, N., Correa-Fiz, F., Lacouture, S., Gottschalk, M., Strutzberg-Minder, K., Bensaid, A., Pina-Pedrero, S., Aragon, V., 2017. A robust PCR for the differentiation of potential virulent strains of *Haemophilus parasuis*. *BMC Vet Res* 13, 124-124.
- Hill, C.E., Metcalf, D.S., MacInnes, J.I., 2003. A search for virulence genes of *Haemophilus parasuis* using differential display RT-PCR. *Vet Microbiol* 96, 189-202.
- Howell, K.J., Peters, S.E., Wang, J., Hernandez-Garcia, J., Weinert, L.A., Luan, S.-L., Chaudhuri, R.R., Angen, Ø., Aragon, V., Williamson, S.M., Parkhill, J., Langford, P.R., Rycroft, A.N., Wren, B.W., Maskell, D.J., Tucker, A.W., 2015. Development of a multiplex PCR assay for rapid molecular serotyping of *Haemophilus parasuis*. *J. Clin. Microbiol.* 53, 3812-3821.
- Howell, K.J., Weinert, L.A., Peters, S.E., Wang, J., Hernandez-Garcia, J., Chaudhuri, R.R., Luan, S.-L., Angen, Ø., Aragon, V., Williamson, S.M., Langford, P.R., Rycroft, A.N., Wren, B.W., Maskell, D.J., Tucker, A.W., 2017. "Pathotyping" multiplex PCR assay for *Haemophilus parasuis*: a tool for prediction of virulence. *J. Clin. Microbiol.* 55, 2617.
- Jia, A., Zhou, R., Fan, H., Yang, K., Zhang, J., Xu, Y., Wang, G., Liao, M., 2017. Development of serotype-specific PCR assays for typing of *Haemophilus parasuis* isolates circulating in Southern China. *J. Clin. Microbiol.* 55, 3249-3257.
- Kielstein, P., Rapp-Gabrielson, V.J., 1992. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *J. Clin. Microbiol.* 30, 862-865.
- Lawrence, P., Bey, R., 2015. Map-based comparative genomic analysis of virulent *Haemophilus parasuis* serovars 4 and 5. *J. Gen.* 3, 59-71.
- Ma, L., Wang, L., Chu, Y., Li, X., Cui, Y., Chen, S., Zhou, J., Li, C., Lu, Z., Liu, J., Liu, Y., 2016. Characterization of Chinese *Haemophilus parasuis* isolates by traditional serotyping and molecular serotyping methods. *P. ONE* 11, e0168903.
- Martínez-Moliner, V., Soler-Llorens, P., Moleres, J., Garmendia, J., Aragon, V., 2012. Distribution of genes involved in sialic acid utilization in strains of *Haemophilus parasuis*. *Microbiology* 158, 2117-2124.
- Nedbalcová, K., Kučerová, Z., 2013. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* isolates associated with porcine pneumonia. *Acta Vet Brno* 82, 3-7.
- Oliveira, S., Galina, L., Pijoan, C., 2001. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 13, 495-501.
- Oliveira, S., Pijoan, C., 2002. Diagnosis of *Haemophilus parasuis* in affected herds and use of epidemiological data to control disease. *J. Swi. Heal. Pro.* 10, 221-225.
- Oliveira, S., Pijoan, C., 2004. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Vet. Microbiol.* 99, 1-12.
- Olvera, A., Pina, S., Macedo, N., Oliveira, S., Aragon, V., Bensaid, A., 2012. Identification of potentially virulent strains of *Haemophilus parasuis* using a multiplex PCR for virulence-associated autotransporters (vtaA). *Vet. J.* 191, 213-218.

- Pina, S., Olvera, A., Barcelo, A., Bensaid, A., 2009. Trimeric autotransporters of *Haemophilus parasuis*: generation of an extensive passenger domain repertoire specific for pathogenic strains. *J. Bacter.* 191, 576-587.
- Rúbies, X., Kielstein, P., Costa, L., Riera, P., Artigas, C., Espuña, E., 1999. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. *Vet. Microbiol.* 66, 245-248.
- Sack, M., Baltes, N., 2009. Identification of novel potential virulence-associated factors in *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.* 136, 382-386.
- Van, C.N., Thanh, T.V.T., Zou, G., Jia, M., Wang, Q., Zhang, L., Ding, W., Huang, Q., Zhou, R., 2019. Characterization of serotypes and virulence genes of *Haemophilus parasuis* isolates from Central Vietnam. *Veterinary Microbiology* 230, 117-122.
- Wang, X., Xu, X., Wu, Y., Li, L., Cao, R., Cai, X., Chen, H., 2013. Polysaccharide biosynthesis protein CapD is a novel pathogenicity-associated determinant of *Haemophilus parasuis* involved in serum-resistance ability. *Vet. Microbiol.* 164, 184-189.
- Wang, X., Xu, X., Zhang, S., Guo, F., Cai, X., Chen, H., 2011. Identification and analysis of potential virulence-associated genes in *Haemophilus parasuis* based on genomic subtraction. *Microbial pathogenesis* 51, 291-296.
- Wang, Z., Zhao, Q., Wei, H., Wen, X., Cao, S., Huang, X., Wu, R., Yan, Q., Huang, Y., Wen, Y., 2017. Prevalence and seroepidemiology of *Haemophilus parasuis* in Sichuan province, China. *Peer. J.* 5, e3379.
- Xu, C., Zhang, L., Zhang, B., Feng, S., Zhou, S., Li, J., Zou, Y., Liao, M., 2013. Involvement of lipooligosaccharide heptose residues of *Haemophilus parasuis* SC096 strain in serum resistance, adhesion and invasion. *Vet. J.* 195, 200-204.
- Yu, J., Wu, J., Zhang, Y., Du, Y., Peng, J., Chen, L., Sun, W., Cong, X., Xu, S., Shi, J., Li, J., Huang, B., Zhu, X., Wang, J., 2014. Identification of putative virulence-associated genes among *Haemophilus parasuis* strains and the virulence difference of different serovars. *Microbiol. Pathog.* 77, 17-23.
- Zhang, J., Xu, C., Guo, L., Shen, H., Deng, X., Ke, C., Ke, B., Zhang, B., Li, A., Ren, T., Liao, M., 2012. Prevalence and characterization of genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* isolates from Southern China. *Can. J. Vet. Res.* 76, 224-229.
- Zhang, P., Zhang, C., Aragon, V., Zhou, X., Zou, M., Wu, C., Shen, Z., 2019. Investigation of *Haemophilus parasuis* from healthy pigs in China. *Vet. Microbiol.* 231, 40-44.
- Zhou, H., Yang, B., Xu, F., Chen, X., Wang, J., Blackall, P.J., Zhang, P., Xia, Y., Zhang, J., Ma, R., 2010. Identification of putative virulence-associated genes of *Haemophilus parasuis* through suppression subtractive hybridization. *Vet. Microbiol.* 144, 377-383.
- Zhou, M., Zhang, Q., Zhao, J., Jin, M., 2012. *Haemophilus parasuis* encodes two functional cytolethal distending toxins: CdtC contains an atypical cholesterol recognition/ interaction region. *PLoS One* 7, 7,s