

Định tính vi khuẩn *Yersinia enterocolitica* gây viêm ruột trên heo nhà (*Sus scrofa domesticus*) bằng Nested PCR

Detection of *Yersinia enterocolitica* causing intestinal inflammation on pigs (*Sus scrofa domesticus*) by Nested PCR

Nguyễn Xuân Mai¹, Phạm Đình Chương^{1*}

¹Trường Đại học Tôn Đức Thắng, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: phamdingchuong@tdtu.edu.vn

THÔNG TIN	TÓM TẮT
DOI:10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.21.1.4672.2026 Ngày nhận: 06/08/2025 Ngày nhận lại: 04/11/2025 Duyệt đăng: 10/11/2025 Từ khóa: heo nhà; nested PCR; <i>Sus scrofa domesticus</i>; viêm ruột; <i>Yersinia enterocolitica</i>	An toàn thực phẩm là một vấn đề cấp thiết khi <i>Yersinia enterocolitica</i>, tác nhân chính gây bệnh Yersiniosis, lây nhiễm từ heo nhà (<i>Sus scrofa domesticus</i>). Tại Hà Nội, tỷ lệ nhiễm khuẩn trong thịt heo lên tới 16.67%. Do các phương pháp phát hiện truyền thống thường tốn thời gian và kém hiệu quả, nghiên cứu đã áp dụng phương pháp Nested PCR để phát hiện <i>Y. enterocolitica</i> nhanh chóng và chính xác trên heo. Hai gen đặc hiệu được xác định qua phân tích tin sinh học là gen EX-sxy làm môi ngoài cho chi <i>Yersinia</i> và gen sxy làm môi trong cho loài <i>Y. enterocolitica</i>. Các bộ môi được đánh giá tính đặc hiệu và khả năng khuếch đại trong điều kiện <i>in vitro</i> và <i>ex vivo</i>, đồng thời kiểm tra với các vi khuẩn đối chứng như <i>Salmonella enterica</i>, <i>Listeria monocytogenes</i> và <i>Bacillus cereus</i>. Phản ứng Nested PCR đã khuếch đại thành công các đoạn gen mục tiêu. Kết quả điện di cho thấy các vạch sản phẩm có kích thước như mong đợi, 1,319bp cho gen EX-sxy và 564bp cho gen sxy. Các cặp môi được chứng minh độ đặc hiệu cao trong cả hai điều kiện, không xảy ra khuếch đại chéo với DNA đối chứng. Nghiên cứu đã phát triển một phương pháp Nested PCR hiệu quả, cung cấp công cụ chẩn đoán sớm và chính xác, góp phần cải thiện an toàn thực phẩm và bảo vệ sức khỏe cộng đồng. ABSTRACT Food safety is an urgent issue as <i>Yersinia enterocolitica</i>, the major cause of Yersiniosis, is transmitted from domestic pigs (<i>Sus scrofa domesticus</i>). In Hanoi, the prevalence of contamination in pork samples has reached 16.67%. Since traditional detection methods are often time-consuming and ineffective, this study employed the Nested PCR method to enable early and accurate identification of <i>Y. enterocolitica</i> in pigs. Two specific genes were identified via bioinformatics analysis: the EX-sxy gene as an external primer for the genus <i>Yersinia</i> and the sxy gene as an internal primer for the species <i>Y. enterocolitica</i>. The primer sets were evaluated for specificity and amplification capabilities under <i>in vitro</i> and <i>ex vivo</i> conditions, and tested with control bacteria such as <i>Salmonella enterica</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, and <i>Bacillus</i>

Keywords:

pigs; nested PCR; *Sus scrofa domestica*; intestinal inflammation; *Yersinia enterocolitica*

cereus. The Nested PCR successfully amplified the target gene fragments. The electrophoresis results showed bands of the expected sizes, 1,319bp for the *EX-sxy* gene and 564bp for the *sxy* gene. The study developed an efficient Nested PCR method, providing a vital tool for early and accurate diagnosis, contributing to enhancing food safety measures and protecting public health.

1. Giới thiệu

An toàn thực phẩm là một mối quan tâm toàn cầu cấp thiết, đặc biệt trong lĩnh vực chăn nuôi, nơi mà các tác nhân gây bệnh từ động vật sang người tiềm ẩn những rủi ro đáng kể đối với sức khỏe cộng đồng. Trong số đó, *Yersinia enterocolitica* nổi bật là nguyên nhân chính gây ra nhiễm trùng đường tiêu hóa, được gọi là bệnh Yersiniosis. Bệnh này thường ủ bệnh từ 03 đến 07 ngày, biểu hiện đa dạng từ nhẹ đến nặng. Các triệu chứng điển hình bao gồm sốt, đau bụng và tiêu chảy, trong đó tiêu chảy đôi khi có máu. Mặc dù bệnh thường tự khỏi trong 01 đến 03 tuần, nhưng ở người lớn có thể bị chẩn đoán nhầm với viêm ruột thừa do các triệu chứng không đặc hiệu và có thể dẫn đến các biến chứng nghiêm trọng như viêm khớp hay nhiễm khuẩn huyết ở một số trường hợp (Chlebicz & Ślizewska, 2018). Theo Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa Dịch bệnh Hoa Kỳ (CDC), *Y. enterocolitica* ước tính gây ra khoảng 117,000 ca bệnh, 640 ca nhập viện và 35 ca tử vong mỗi năm tại Hoa Kỳ. Tỷ lệ mắc bệnh cao hơn thường được ghi nhận ở trẻ em với các đợt bùng phát dịch thường xuyên xảy ra vào những tháng mùa đông (Angelovska & ctg., 2023).

Heo được xác định là vật chủ chính của *Y. enterocolitica*, mặc dù vi khuẩn này cũng phân bố rộng rãi trong môi trường và nhiều loài động vật khác. Đáng chú ý, heo thường không biểu hiện triệu chứng bệnh khi mang vi khuẩn và *Y. enterocolitica* cư trú ở nhiều vị trí trong cơ thể heo như lưỡi, amidan, hạch bạch huyết, sau đó được bài tiết qua phân, tạo nguy cơ lây nhiễm chéo trong quá trình giết mổ và chế biến thịt (Chlebicz & Ślizewska, 2018). Tại Việt Nam, tình hình an toàn thực phẩm đang đối mặt với nhiều thách thức nghiêm trọng với hàng trăm vụ ngộ độc thực phẩm được ghi nhận hằng năm, trong đó có sự hiện diện của *Y. enterocolitica* trong chuỗi giá trị thịt heo. Cụ thể, một nghiên cứu tại Hà Nội vào năm 2020 đã điều tra sự lưu hành của vi khuẩn này. Từ 120 mẫu thu thập từ 30 con heo tại các lò mổ, 20 chủng *Y. enterocolitica* đã được phân lập, tương ứng với tỷ lệ nhiễm trên thịt heo là 16.67%. Dù tỷ lệ lưu hành này được đánh giá ở mức trung bình nhưng đây vẫn là một nguy cơ tiềm ẩn đáng kể gây ngộ độc thực phẩm ở người (Luu & ctg., 2020).

Các phương pháp nuôi cấy thông thường hay phương pháp sinh hóa đã được mô tả trong nhiều nghiên cứu để xác định vi khuẩn này. Tuy nhiên, các phương pháp này đều phức tạp, mất nhiều thời gian và độ nhạy hạn chế. Vì thế, việc nghiên cứu và phát triển một phương pháp định tính mới với thời gian thực hiện nhanh là vô cùng cần thiết (Pal & ctg., 2023). Trong sinh học phân tử, kỹ thuật polymerase reaction chain (PCR) là một phương pháp phổ biến và đáng tin cậy giúp phát hiện mầm bệnh một cách nhanh chóng với độ chính xác cao. Kỹ thuật này đã phát triển mạnh mẽ và hiện có nhiều biến thể khác nhau (Rahman & ctg., 2013). Tuy nhiên, khi áp dụng vào các mẫu sinh học phức tạp (như mẫu ruột heo trong nghiên cứu này), PCR thông thường thường gặp hai thách thức lớn: (1) giới hạn phát hiện không đủ nhạy để định danh mầm bệnh ở nồng độ rất thấp và (2) tính đặc hiệu bị ảnh hưởng do sự hiện diện của các chất ức chế và các trình tự DNA không đặc hiệu trong mẫu nền. Để khắc phục những hạn chế này, nghiên cứu lựa chọn kỹ thuật Nested PCR. Đây là một biến thể PCR tiên tiến sử dụng hai cặp mồi tuần tự (mồi ngoài và mồi trong) qua hai chu kỳ khuếch đại liên tiếp. Cơ chế hai bước này không chỉ

loại bỏ hiệu quả các sản phẩm không đặc hiệu và giảm thiểu ảnh hưởng của chất ức chế từ phản ứng đầu tiên, mà còn tăng cường đáng kể độ nhạy và tính đặc hiệu. Nhờ ưu điểm này, Nested PCR cho phép định danh tác nhân gây bệnh ngay cả ở ngưỡng phát hiện rất thấp, đồng thời rút ngắn đáng kể thời gian so với các phương pháp nuôi cấy truyền thống, từ đó củng cố độ tin cậy của kết quả chẩn đoán phân tử (Green & Sambrook, 2019; Wanger & ctg., 2017).

Bên cạnh đó, để tối ưu hóa tính đặc hiệu và liên kết trực tiếp với tiềm năng gây bệnh, nghiên cứu tập trung vào việc xác định hai gen mục tiêu: gen *EX-sxy* đại diện cho chi *Yersinia* (được sử dụng để thiết kế môi ngoài) và gen *sxy* đặc hiệu cho loài *Y. enterocolitica* (được sử dụng để thiết kế môi trong). Theo nhiều nghiên cứu, gen *sxy* (còn được gọi là *tfoX*) đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa khả năng hấp thụ DNA tự nhiên ở vi khuẩn. Gen này mã hóa protein Sxy hỗ trợ yếu tố phiên mã toàn cầu CRP (cAMP Receptor Protein) kích hoạt biểu hiện của các gen liên quan đến quá trình vi khuẩn thu nhận các đoạn DNA ngoại lai. Khả năng này là một cơ chế quan trọng của chuyển gen ngang, cho phép vi khuẩn thu nhận các đoạn DNA ngoại lai, bao gồm cả các yếu tố độc lực hoặc gen kháng kháng sinh từ môi trường, từ đó gia tăng khả năng thích nghi và gây bệnh của vi khuẩn. Việc lựa chọn gen *sxy* là đối tượng phát hiện không chỉ đảm bảo độ chính xác trong định danh loài mà còn liên kết trực tiếp với khả năng thích nghi và tiềm năng gây bệnh của chủng vi khuẩn *Y. enterocolitica* (Cameron & ctg., 2008; Seitz & Blokesch, 2013a; Seitz & Blokesch, 2013b; Sun & ctg., 2013; Yamamoto & ctg., 2011).

Nghiên cứu này nhằm mục đích phát triển một phương pháp định tính nhanh, chính xác và có độ nhạy cao để phát hiện *Y. enterocolitica* ở heo bằng kỹ thuật Nested PCR. Để đạt được mục tiêu này, các nội dung nghiên cứu chính sẽ bao gồm: nghiên cứu tổng quan về đặc điểm và cơ chế gây bệnh của *Y. enterocolitica*, xác định các gen đặc hiệu của vi khuẩn này và chi *Yersinia* thông qua phân tích tin sinh học, thiết kế bộ môi ngoài và bộ môi trong có độ đặc hiệu cao, sau đó đánh giá thực nghiệm độ đặc hiệu và độ nhạy của môi thông qua PCR trong cả điều kiện *in vitro* và *ex vivo* sử dụng các mẫu ruột heo. Kết quả mong đợi từ nghiên cứu là cung cấp một công cụ hiệu quả cho việc xác định sớm và chính xác vi khuẩn *Y. enterocolitica*, góp phần tăng cường các biện pháp an toàn thực phẩm và bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Xác định các gen đặc hiệu cho vi khuẩn *Y. enterocolitica*

Trong nghiên cứu này, trình tự bộ gen (genome) của vi khuẩn *Y. enterocolitica* được tìm kiếm trong cơ sở dữ liệu của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information - NCBI), dựa vào đó lựa chọn những gen có tiềm năng làm dấu chuẩn mới, chưa từng được ứng dụng rộng rãi trong các phương pháp PCR định danh *Y. enterocolitica* trước đây. Tính đặc hiệu của các gen này được đánh giá bằng phần mềm Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) để so sánh các trình tự của *Y. enterocolitica* với các trình tự hiện có trong cơ sở dữ liệu NCBI, từ đó tính toán mức độ tương đồng giữa các trình tự. Mục tiêu của quá trình này là xác định những gen có tính đặc hiệu cao, được biểu thị bằng giá trị Percent Identity (phần trăm tương đồng) và Query Coverage (độ bao phủ) cao khi so sánh với các chủng *Y. enterocolitica*, đồng thời cho thấy sự khác biệt rõ rệt (giá trị thấp) khi đối chiếu với gen của các loài vi khuẩn khác. Khi các trình tự gen đặc hiệu của *Y. enterocolitica* được xác định, chúng sẽ được mở rộng về cả hai phía và đánh giá tính đặc hiệu của chúng đối với chi *Yersinia*. Các thông tin liên quan đến vị trí gen, mã số truy cập vào ngân hàng dữ liệu và protein được mã hóa bởi gen đó đều được ghi nhận đầy đủ để phục vụ cho các phân tích tiếp theo.

2.2. Thiết kế và đánh giá các bộ môi bằng các phần mềm tin sinh

Dựa vào các gen đặc hiệu đã tìm được, bộ môi ngoài đặc hiệu cho chi *Yersinia* và bộ môi trong đặc hiệu cho loài *Y. enterocolitica* được thiết kế bằng phần mềm Primer3Plus và được điều chỉnh theo các nguyên tắc thiết kế môi. Độ dài của môi nên nằm trong khoảng từ 15 đến 30 nucleotide, trong đó độ dài tối ưu là từ 18 đến 22 nucleotide. Nhiệt độ nóng chảy (T_m) là nhiệt độ mà tại đó sợi đôi DNA tách thành hai mạch đơn; nhiệt độ này được duy trì trong khoảng 55°C đến 65°C, với sự chênh lệch không quá 2°C giữa hai môi, được tính bằng công thức:

$$T_m = 4^{\circ}\text{C} \times (G + C) + 2^{\circ}\text{C} \times (A + T). \quad (1)$$

Nhiệt độ bắt cặp (T_a) là nhiệt độ sử dụng trong phản ứng PCR để môi có thể gắn vào sợi DNA khuôn, giá trị này được tính dựa trên nhiệt độ nóng chảy (T_m) theo công thức:

$$T_a = T_m - 5^{\circ}\text{C}. \quad (2)$$

Mật độ GC của môi nên nằm trong khoảng 40% đến 60%, vì nó ảnh hưởng đến độ ổn định và điều kiện bắt cặp. Bên cạnh đó, cần có ít nhất 1 nucleotide G hoặc C ở đầu 3' của môi (kẹp GC) để đầu 3' của môi liên kết mạnh hơn, nhưng trong 5 nucleotide đầu tiên, không nên sử dụng quá 3 nucleotide G hoặc C để duy trì đặc tính gắn kết tối ưu. Ngoài ra, cần tránh sự lặp lại trong trình tự môi vì sự lặp lại trình tự đôi (ví dụ: ATATATAT) hay trình tự đơn (ví dụ: GGGGG) có thể dẫn đến ghép cặp sai trong quá trình PCR. Để giảm thiểu rủi ro này, môi chỉ nên có tối đa 03 lần lặp lại trong trình tự. Cuối cùng, tính đặc hiệu của các cặp môi sẽ được đánh giá thông qua phần mềm tin sinh Primer-BLAST trên NCBI.

2.3. Nuôi cấy và tăng sinh vi khuẩn *Y. enterocolitica* và các vi khuẩn đối chứng

Vi khuẩn *Y. enterocolitica* và các vi khuẩn đối chứng (*Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* và *Bacillus cereus*) bảo quản ở -80°C được hoạt hóa để nuôi cấy và tăng sinh. Sau đó, sinh khối của các vi khuẩn này được thu nhận và sử dụng cho quá trình tách chiết và tinh sạch genome. Vi khuẩn *Y. enterocolitica* được nuôi cấy trên môi trường thạch MacConkey (Himedia, Ấn Độ), các vi khuẩn đối chứng được nuôi cấy trên môi trường thạch BHI (Brain Heart Infusion, Himedia, Ấn Độ), sau đó ủ ở 37°C trong 24 giờ. Tiếp theo là tăng sinh vi khuẩn lần 1, khuẩn lạc đơn được lấy bằng que cấy vòng vô trùng và chuyển vào falcon 15mL có chứa 10mL môi trường lỏng BHI (Himedia, Ấn Độ), sau đó đặt vào tủ âm lạnh ổn nhiệt với thông số lắc 180 vòng/phút, ở 37°C trong 24 giờ. Đối với tăng sinh lần 2, 1mL dịch tăng sinh lần 1 được chuyển vào erlen chứa 100mL môi trường lỏng BHI, các thông số lắc và ủ tương tự như tăng sinh lần 1. Môi trường sử dụng cho toàn bộ quá trình đều được khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 15 phút.

2.4. Tách chiết và tinh sạch genome vi khuẩn từ dịch tăng sinh

Phương pháp tách chiết acid nucleic (DNA/RNA) sử dụng cột silica là một kỹ thuật mang lại hiệu suất thu hồi cao và độ tinh sạch tốt. Nguyên lý dựa trên hoạt động của các muối chaotropic như guanidine HCl, guanidine thiocyanate và urea. Các muối này làm mất ổn định cấu trúc sinh học và tạo điều kiện thuận lợi cho acid nucleic liên kết với màng silica. Giai đoạn đầu tiên của quá trình tinh sạch genome là ly giải tế bào, mẫu vi khuẩn được xử lý bằng dung dịch đệm ly giải chứa muối chaotropic và proteinase K nhằm phá vỡ màng tế bào, màng nhân của vi khuẩn và biến tính protein, giải phóng acid nucleic. Giai đoạn tiếp theo là gắn kết, trong đó ethanol hoặc isopropanol được thêm vào để tạo điều kiện cho acid nucleic liên kết với màng silica. Các thành phần không mong muốn như protein, lipopolysaccharide và các tạp chất khác sau đó được loại bỏ triệt để thông qua giai đoạn rửa bằng dung dịch đệm chứa nồng độ muối và

ethanol cao. Cuối cùng, DNA được rửa giải bằng dung dịch đệm pH kiềm sau khi hoàn thành bước làm khô cột để loại bỏ hoàn toàn ethanol - chất gây ức chế PCR còn sót lại. Sự thay đổi điều kiện hóa lý này đảo ngược quá trình khử nước, làm DNA tái hydrat hóa và phân ly khỏi bề mặt, thu được DNA genome có độ tinh sạch cao (Lorena & ctg., 2023; Vandeventer & ctg., 2012; Vandeventer & ctg., 2013).

Tách chiết và tinh sạch thu genome vi khuẩn *Y. enterocolitica* và các vi khuẩn đối chứng (*S. enterica*, *L. monocytogenes* và *B. cereus*) được tiến hành thông qua bộ kit tách chiết theo phương pháp cột silica là TopPURE® GENOMIC DNA EXTRACTION KIT (ABT, Việt Nam), quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.5. Định lượng DNA sau quá trình tách chiết và tinh sạch

Việc xác định nồng độ DNA trong mẫu là bước quan trọng để tính toán chính xác lượng mẫu cần thiết cho các phản ứng PCR, đảm bảo hiệu suất khuếch đại tối ưu và kết quả đáng tin cậy. Việc định lượng nồng độ và đánh giá độ tinh sạch của DNA thường được thực hiện bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) sử dụng máy quang phổ ở các bước sóng đặc trưng, phổ biến là 260nm và 280nm. Ở những bước sóng này, DNA hấp thụ ánh sáng mạnh mẽ (Clark & Christopher, 2000; Dash & ctg., 2020; Green & Sambrook, 2018). Dựa trên nguyên lý này, nồng độ DNA sợi đôi (dsDNA) được tính bằng công thức:

$$[\text{dsDNA}] = 50 \mu\text{g/mL} \times \text{OD}_{260\text{nm}} \times K. \quad (3)$$

Trong đó, đối với DNA sợi đôi, một đơn vị mật độ quang ở 260nm tương ứng với nồng độ DNA là 50 $\mu\text{g/mL}$ và K là hệ số pha loãng của mẫu. Ngoài ra, tỷ lệ hấp thụ ở bước sóng 260nm so với 280nm, ký hiệu là η , được dùng để đánh giá độ tinh sạch của DNA, biểu diễn bằng công thức như sau:

$$\eta = \text{OD}_{260\text{nm}} / \text{OD}_{280\text{nm}}. \quad (4)$$

Tỷ lệ này lý tưởng nằm trong khoảng từ 1.8 đến 2.0, cho thấy DNA có độ tinh khiết cao. Nếu tỷ lệ này nhỏ hơn 1.8, mẫu có thể có sự hiện diện của protein hoặc các chất tạp nhiễm khác. Ngược lại, nếu tỷ lệ lớn hơn 2.0, mẫu có thể bị nhiễm RNA (Clark & Christopher, 2000).

2.6. Đánh giá thực nghiệm tính đặc hiệu của các bộ môi bằng phản ứng PCR

Để kiểm tra độ đặc hiệu của các cặp môi được thiết kế, nghiên cứu tiến hành phản ứng PCR đơn môi (Singleplex PCR) sử dụng DNA khuôn từ genome *Y. enterocolitica*. Trước hết, hai loại hỗn hợp môi sử dụng trong Singleplex PCR được chuẩn bị từ dung dịch môi gốc 100 μM . Cụ thể, môi xuôi và môi ngược của bộ môi ngoài được pha loãng trong nước cất tinh khiết để tạo thành hỗn hợp môi có nồng độ 10 μM . Tương tự, môi xuôi và môi ngược của bộ môi trong cũng được pha loãng trong nước cất tinh khiết để đạt nồng độ 10 μM . Thành phần phản ứng Singleplex PCR gồm 10 μL dung dịch Mastermix 2X và 2 μL hỗn hợp môi 10 μM (tương ứng với bộ môi ngoài hoặc bộ môi trong cần đánh giá). Nhằm tối ưu hóa phản ứng PCR, nồng độ DNA khuôn được chuẩn hóa ở 100 ng/phản ứng; theo đó, thể tích DNA khuôn và nước cất tinh khiết sẽ được điều chỉnh linh hoạt để đạt tổng thể tích phản ứng là 20 μL .

Bên cạnh đó, tính đặc hiệu của các bộ môi này cũng được đánh giá kỹ lưỡng thông qua các phản ứng PCR với DNA khuôn từ genome của vi khuẩn đối chứng như *S. enterica*, *L. monocytogenes* và *B. cereus*. Mục tiêu là đảm bảo các môi chỉ gắn kết và khuếch đại chính xác đoạn DNA mong muốn trên *Y. enterocolitica*, tránh tình trạng phản ứng chéo với các loài vi khuẩn khác, từ đó nâng cao độ tin cậy của kết quả thu được. Quy trình PCR được kiểm soát bởi

chứng nội ngoại sinh (Exogenous Internal Control - Exogenous IC) nhằm đảm bảo chất lượng phản ứng và tránh các sai lệch về dương/âm tính giả. Thành phần của phản ứng PCR gồm 10 μ L dung dịch Mastermix 2X, 2 μ L hỗn hợp mỗi 10 μ M, 1 μ L DNA IC 100 μ g/mL, thể tích DNA khuôn (nồng độ cuối là 100 ng/phản ứng) và nước cất tinh khiết sẽ được điều chỉnh linh hoạt để đạt tổng thể tích phản ứng là 20 μ L.

Đối với cặp mồi ngoài, chu trình nhiệt PCR được thực hiện với biến tính ban đầu ở 95°C trong 05 phút, sau đó là 35 chu kỳ luân nhiệt gồm biến tính (95°C, 30 giây), bắt cặp (53°C, 30 giây) và kéo dài (72°C, 1 phút), cuối cùng kéo dài sản phẩm ở 72°C trong 07 phút và giữ ở 4°C. Đối với cặp mồi trong, chu trình nhiệt PCR được thực hiện với biến tính ban đầu ở 95°C trong 05 phút, sau đó là 35 chu kỳ luân nhiệt gồm biến tính (95°C, 30 giây), bắt cặp (53°C, 30 giây) và kéo dài (72°C, 25 giây), cuối cùng là kéo dài sản phẩm ở 72°C trong 07 phút và giữ ở 4°C.

2.7. *In vitro* Nested PCR

Trong *in vitro* Nested PCR, với phản ứng PCR đầu tiên, hỗn hợp mỗi nồng độ 10 μ M được chuẩn bị với thành phần gồm mỗi xuôi và mỗi ngược của bộ mồi ngoài, mỗi xuôi và mỗi ngược của bộ mồi chứng nội ngoại sinh pha loãng trong nước cất tinh khiết. Thành phần phản ứng PCR gồm 10 μ L dung dịch Mastermix 2X, 2 μ L hỗn hợp mỗi 10 μ M, 1 μ L DNA IC 100 μ g/mL, thể tích DNA khuôn (nồng độ cuối là 100 ng/phản ứng) và nước cất tinh khiết sẽ được điều chỉnh linh hoạt để đạt tổng thể tích phản ứng là 20 μ L. Trong đó, DNA khuôn là genome vi khuẩn *Y. enterocolitica*. Phản ứng PCR đầu tiên được thực hiện với chu trình nhiệt là biến tính ban đầu ở 95°C trong 05 phút, sau đó là 35 chu kỳ luân nhiệt gồm biến tính (95°C, 30 giây), bắt cặp (53°C, 30 giây) và kéo dài (72°C, 01 phút), cuối cùng là kéo dài sản phẩm ở 72°C trong 07 phút và giữ ở 4°C.

Trong quá trình hoàn tất phản ứng PCR đầu tiên, hỗn hợp mỗi 10 μ M cho phản ứng PCR thứ hai (Nested PCR) được chuẩn bị gồm mỗi xuôi và mỗi ngược của bộ mồi trong, mỗi xuôi và mỗi ngược của bộ mồi chứng nội ngoại sinh pha loãng trong nước cất tinh khiết. Sau khi phản ứng PCR đầu tiên hoàn thành, sản phẩm của phản ứng này sẽ là DNA khuôn cho phản ứng PCR thứ hai. Nested PCR được thực hiện với các thành phần phản ứng gồm 10 μ L dung dịch Mastermix 2X, 2 μ L hỗn hợp mỗi 10 μ M, 0.5 - 1 μ L DNA khuôn và thể tích nước cất tinh khiết sẽ được điều chỉnh linh hoạt để đạt tổng thể tích phản ứng là 20 μ L. Chu trình nhiệt của phản ứng Nested PCR là biến tính ban đầu ở 95°C trong 05 phút, sau đó là 35 chu kỳ luân nhiệt gồm biến tính (95°C, 30 giây), bắt cặp (53°C, 30 giây) và kéo dài (72°C, 25 giây), cuối cùng là kéo dài sản phẩm ở 72°C trong 07 phút và giữ ở 4°C.

2.8. Phân tích kết quả bằng phương pháp điện di trên gel agarose

Genome thu được sau quá trình tinh sạch hoặc các sản phẩm của phản ứng PCR được phân tích kết quả bằng phương pháp điện di trên gel agarose. Trong nghiên cứu này, dung dịch đệm sử dụng để chạy điện di là Tris-Acetate-EDTA (TAE) có nồng độ là 1X. Dung dịch này được pha từ 20mL dung dịch TAE 50X đậm đặc và định mức lên 1L bằng nước cất hai lần. Song song đó, gel agarose 1% (w/v) cũng được chuẩn bị bằng cách cân chính xác 1g agarose và hòa tan hoàn toàn trong 100mL dung dịch đệm TAE 1X đã pha. Hỗn hợp này được đun nóng trong lò vi sóng cho đến khi agarose tan chảy hoàn toàn, sau đó được làm nguội đến khoảng 55 - 60°C và đổ vào khuôn gel. Khi gel đã đông đặc lại, nhẹ nhàng gỡ lược ra khỏi khuôn gel và chuyển gel vào buồng điện di chứa dung dịch đệm. Đối với chuẩn bị mẫu, thang DNA hoặc các

mẫu phân tích (genome vi khuẩn hay sản phẩm PCR) được pha với Gelred 6X theo tỷ lệ thể tích 5:1, cụ thể là 5 μ L thang chuẩn hoặc mẫu phân tích với 1 μ L Gelred 6X tạo thành tổng thể tích 6 μ L. Các mẫu được nạp cẩn thận vào các giếng trên gel. Thiết bị điện di được kích hoạt và đặt điện áp ở mức 100V trong 20 phút. Sự di chuyển của các vạch màu từ loading dye sẽ giúp theo dõi tiến trình chạy điện di. Cuối cùng, sau khi quá trình điện di kết thúc, gel được lấy ra và đặt vào buồng tối của hệ thống hình ảnh UVITEC để quan sát và phân tích kết quả (Mesapogu & ctg., 2013).

2.9. Thiết kế thí nghiệm cảm nhiễm trên ruột heo

Thí nghiệm được thực hiện nhằm đánh giá tính đặc hiệu của các cặp môi đã thiết kế trong điều kiện *ex vivo*, sử dụng mẫu gây cảm nhiễm là mẫu ruột heo. Mục tiêu chính là thu thập mẫu ruột heo đã gây nhiễm với *Y. enterocolitica*, đồng thời chuẩn bị mẫu đối chứng âm (môi trường nuôi cấy vi khuẩn là BHI lỏng) và đối chứng với vi khuẩn khác (*B. cereus*). Sau khi tách chiết và tinh sạch genome từ các mẫu này, chúng sẽ được dùng trong phản ứng Nested PCR để xác định độ chính xác của các cặp môi dưới điều kiện *ex vivo*.

Dựa trên nghiên cứu của Dang và cộng sự (2018) và được điều chỉnh phù hợp với mục tiêu nghiên cứu, thí nghiệm được thiết kế gồm 04 nghiệm thức gồm mẫu ruột heo không nhiễm, mẫu ruột heo ủ trong môi trường BHI lỏng, mẫu ruột heo nhiễm vi khuẩn *B. cereus* và mẫu ruột heo nhiễm vi khuẩn *Y. enterocolitica*. Các mẫu ruột heo ở từng nghiệm thức được gây nhiễm theo các thông số ở Bảng 1.

Bảng 1

Các Nghiệm Thức Gây Cảm Nhiễm trên Mẫu Ruột Heo

Nghiệm thức	1	2	3	4
Ruột heo	25mg	25mg	25mg	25mg
Môi trường lỏng BHI	-	2mL	-	-
Dịch vi khuẩn <i>B. cereus</i>	-	-	2mL	-
Dịch vi khuẩn <i>Y. enterocolitica</i>	-	-	-	2mL

Ghi chú. Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Nồng độ vi khuẩn được sử dụng trong thí nghiệm là khoảng 10^6 CFU/mL. Mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần. Sau khi chuẩn bị, các mẫu được ủ ở 37°C trong 02 giờ.

2.10. Tách chiết và tinh sạch genome của các nghiệm thức cảm nhiễm

Genome từ các nghiệm thức cảm nhiễm được thu nhận bằng DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Đức), quy trình thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.11. *ex vivo* Nested PCR

Sau khi thu nhận genome ruột heo của các nghiệm thức thông qua quá trình tinh sạch, kỹ thuật Nested PCR được triển khai để phát hiện sự hiện diện của vi khuẩn *Y. enterocolitica* có trong mẫu ruột heo cảm nhiễm. Quy trình này sử dụng chứng nội sinh để kiểm soát quá trình tách chiết và PCR.

Với phản ứng PCR đầu tiên, hỗn hợp môi 10 μ M gồm bộ môi ngoài và bộ môi chứng nội sinh pha loãng trong nước cất tinh khiết được chuẩn bị. Thành phần phản ứng PCR đầu tiên gồm 10 μ L dung dịch Mastermix 2X, 2 μ L hỗn hợp môi 10 μ M đã pha, thể tích DNA khuôn (nồng

độ cuối là 100 ng/phản ứng) và nước cất tinh khiết sẽ được điều chỉnh linh hoạt để đạt tổng thể tích phản ứng là 20 μ L, trong đó DNA khuôn là genome trích ly từ nghiệm thức cảm nhiễm. Chu trình nhiệt của phản ứng gồm biến tính ban đầu ở 95°C trong 05 phút, sau đó là 35 chu kỳ luân nhiệt gồm biến tính (95°C, 30 giây), bắt cặp (53°C, 30 giây) và kéo dài (72°C, 01 phút), cuối cùng là kéo dài sản phẩm ở 72°C trong 07 phút và giữ ở 4°C.

Trong thời gian chờ phản ứng PCR đầu tiên hoàn tất, chuẩn bị hỗn hợp mỗi 10 μ M cho phản ứng PCR thứ hai (*ex vivo* Nested PCR) gồm bộ mỗi trong và bộ mỗi chứng nội sinh pha loãng trong nước cất tinh khiết. Tiếp theo, hỗn hợp phản ứng *ex vivo* Nested PCR được chuẩn bị theo thông số tương tự phản ứng PCR đầu tiên, trong đó DNA khuôn là sản phẩm của phản ứng đầu tiên. Chu trình nhiệt của phản ứng được thiết lập là biến tính ban đầu ở 95°C trong 05 phút, sau đó là 35 chu kỳ luân nhiệt gồm biến tính (95°C, 30 giây), bắt cặp (53°C, 30 giây) và kéo dài (72°C, 25 giây), cuối cùng là kéo dài sản phẩm ở 72°C trong 07 phút và giữ ở 4°C. Sau đó, các sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose 1% (w/v) với điện áp 100V trong 20 phút. Sau đó kết quả được quan sát và phân tích bằng hệ thống chụp gel UVITEC.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Các gen đặc hiệu cho vi khuẩn *Y. enterocolitica*

Dựa trên kết quả phân tích từ phần mềm BLAST, gen *sxy* (mã số truy cập: LR590469.1 - vùng: 1504282 - 1504917) có giá trị phần trăm tương đồng là 100% và độ bao phủ trên 96% khi so sánh với các chủng khác cùng loài, điều này cho thấy mức độ tương đồng cao trong trình tự gen *sxy* giữa các chủng *Y. enterocolitica*. Đồng thời, trình tự gen *sxy* của *Y. enterocolitica* không tìm thấy sự tương đồng với trình tự từ các loài vi khuẩn khác không thuộc loài *Y. enterocolitica*. Các kết quả trên chỉ ra rằng gen *sxy* là đặc trưng cho vi khuẩn *Y. enterocolitica*. Đoạn gen này được chọn làm trình tự gen bên trong, trình tự gen bên ngoài được xác định bằng cách mở rộng tìm kiếm ra hai phía của đoạn gen *sxy* đã chọn, ký hiệu là *EX-sxy*. Tương tự như gen *sxy*, công cụ BLAST được sử dụng để đánh giá tính đặc hiệu của gen *EX-sxy* đối với chi *Yersinia*. Kết quả cho thấy trình tự gen *EX-sxy* thể hiện mức độ tương đồng cao với vi khuẩn thuộc chi *Yersinia*, thể hiện qua các giá trị phần trăm tương đồng trên 99% và độ bao phủ trên 80%. Ngoài ra, trình tự gen *EX-sxy* cũng không tìm thấy sự tương đồng với trình tự của các chi vi khuẩn khác. Từ các kết quả phân tích này, có thể kết luận rằng gen *EX-sxy* là đặc hiệu cho chi *Yersinia*.

3.2. Các bộ mỗi được thiết kế và sử dụng trong nghiên cứu

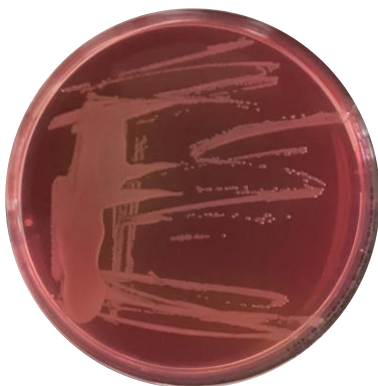
Các bộ mỗi được thiết kế dựa trên trình tự gen *EX-sxy* và *sxy* gồm cặp mỗi ngoài (YE-*EX-sxy*) được thiết kế đặc hiệu cho chi *Yersinia* và cặp mỗi trong (YE-*sxy*) đặc hiệu cho loài *Y. enterocolitica*. Ngoài ra, toàn bộ quy trình từ tinh sạch genome đến các quá trình PCR đều được kiểm soát chặt chẽ bằng cách sử dụng hai cặp mỗi chứng nội là Exogenous IC và IC-SUS; trong đó, cặp mỗi IC-SUS được thiết kế để xác nhận nguồn gốc genome sau tinh sạch thực sự là từ heo nhà (*Sus scrofa domesticus*). Các cặp mỗi được thiết đáp ứng nhiều tiêu chí quan trọng nhằm tối ưu hóa hiệu quả của Nested PCR. Điều này bao gồm việc cân nhắc nhiệt độ bắt cặp phù hợp (đồng nhất ở 53°C), đảm bảo sự khác biệt rõ rệt về kích thước sản phẩm khuếch đại để thuận tiện cho việc phân tích trên gel điện di và tỷ lệ nucleotide tối ưu. Bên cạnh đó, để đảm bảo rằng các mỗi thiết kế không liên kết với các loài vi khuẩn khác, phần mềm Primer-BLAST được sử dụng để xác nhận tính đặc hiệu của các cặp mỗi. Kết quả thiết kế mỗi được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2*Trình Tự các Môi Sử Dụng trong Nghiên Cứu*

Tên môi	Trình tự môi (5' – 3')	T _a (°C)	Kích thước sản phẩm (bp)
Bộ môi ngoài đặc hiệu cho chi <i>Yersinia</i>			
YE-EX-sxy-FP	TTG CCT CAA CCA CAC CAT G	53	1,319
YE-EX-sxy-RP	CAC AAG TTC ACT GAT AAG GC	53	
Bộ môi trong đặc hiệu cho loài <i>Yersinia enterocolitica</i>			
YE-sxy-FP	CAT TCA ATT AGC TCG CTA CG	53	564
YE-sxy-RP	CAA GAT AAT GCA GGC TCG G	53	
Bộ môi chứng nội ngoại sinh			
Exogenous IC-FP	ACA TAC TAC AGG TCC AAG TG	53	102
Exogenous IC-RP	AGG GAG AAC TGG TTC TTG G	53	
Bộ môi chứng nội nội sinh			
IC-SUS-FP	CAC CTA TTT AAG CAT ACG CC	53	114
IC-SUS-RP	TGT GTT TAT GGA GCT GTG AG	53	

Ghi chú. Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu**3.3. Kết quả nuôi cấy và tăng sinh vi khuẩn *Y. enterocolitica***

Kết quả nuôi cấy *Y. enterocolitica* trên môi trường thạch MacConkey sau 24 giờ ủ ở 37°C thể hiện trong Hình 1 cho thấy các khuẩn lạc tròn, nhỏ, kích thước 01 - 02mm, có màu hồng nhạt và hơi gồ lên. Những đặc điểm này tương đồng với mô tả trong nghiên cứu của Barton (2011). Sau đó, quá trình tăng sinh được thực hiện hai lần để đạt mật độ vi khuẩn cần thiết cho quá trình tách chiết DNA. Sau mỗi lần tăng sinh, dung dịch nuôi cấy đều có độ đục và hình thành lớp sinh khối mỏng lắng ở đáy, cho thấy sự phát triển mạnh mẽ của vi khuẩn, khẳng định quá trình tăng sinh đã diễn ra thành công.

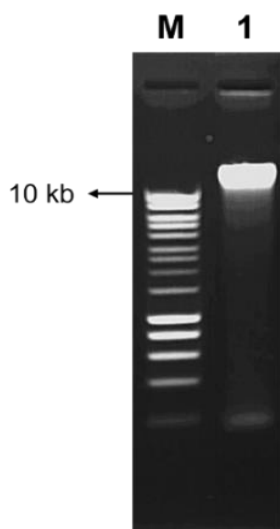
Hình 1*Yersinia Enterocolitica trên Môi Trường Thạch Macconkey sau 24 Giờ Ủ ở 37°C**Ghi chú.* Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

3.4. Kết quả tinh sạch genome vi khuẩn *Y. enterocolitica* từ dịch tăng sinh

Dữ liệu điện di trong Hình 2 thể hiện một vạch sáng, to và rõ ràng nằm gần giếng, phía trên vạch 10kb của thang chuẩn DNA. Những yếu tố này xác nhận genome vi khuẩn *Y. enterocolitica* sau tinh sạch đạt các tiêu chí cần thiết: kích thước bộ gen lớn phù hợp với kích thước gen vi khuẩn, không bị phân mảnh và có hàm lượng DNA đủ nhiều.

Hình 2

Kết Quả Điện Di của Quá Trình Tinh Sạch Genome Vi Khuẩn Y. Enterocolitica



Ghi chú. Giếng M: Thang chuẩn DNA 1 kb; Giếng 1: Genome vi khuẩn *Y. enterocolitica*. Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

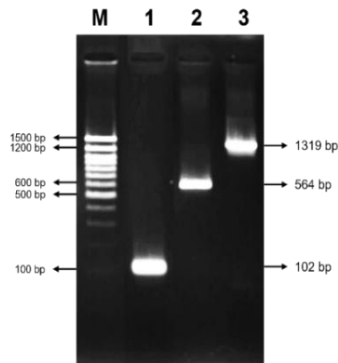
Bên cạnh đó, đo mật độ quang được thực hiện nhằm định lượng chính xác hàm lượng DNA, phục vụ cho việc tính toán tối ưu hóa các phản ứng PCR. Nồng độ DNA của genome *Y. enterocolitica* được xác định là 151.5 $\mu\text{g/mL}$ và độ tinh sạch đạt 1.87. Giá trị độ tinh sạch trong khoảng 1.8 - 2.0 được coi là lý tưởng cho DNA, cho thấy mẫu đạt độ tinh khiết cao và ít tạp nhiễm protein hay các chất khác. Tổng hợp kết quả từ cả hai phương pháp đánh giá, có thể kết luận rằng genome *Y. enterocolitica* thu được có chất lượng cao, hoàn toàn đáp ứng yêu cầu cho các thí nghiệm tiếp theo như Singleplex PCR và *in vitro* Nested PCR.

3.5. Kết quả đánh giá tính đặc hiệu của các bộ môi bằng phản ứng PCR

Kết quả điện di của phản ứng Singleplex PCR được trình bày trong Hình 3 cho thấy sự khuếch đại thành công các đoạn gen mục tiêu. Cụ thể, giếng 1 hiển thị vạch DNA có kích thước 102bp tương ứng với tín hiệu của chứng nội ngoại sinh (Exogenous IC), giếng 2 thể hiện vạch DNA 564bp là sản phẩm khuếch đại của gen *sxy* bằng bộ môi trong (YE-*sxy*), giếng 3 xuất hiện băng DNA 1,319bp là kết quả khuếch đại của gen *EX-sxy* bằng bộ môi ngoài (YE-*EX-sxy*). Tất cả các sản phẩm khuếch đại đều có kích thước chính xác như dự kiến, tạo ra các vạch to, sáng, rõ và không bị lẫn các sản phẩm không đặc hiệu hay môi thừa.

Hình 3

Kết Quả Điện Di của Phản Ứng Singleplex PCR

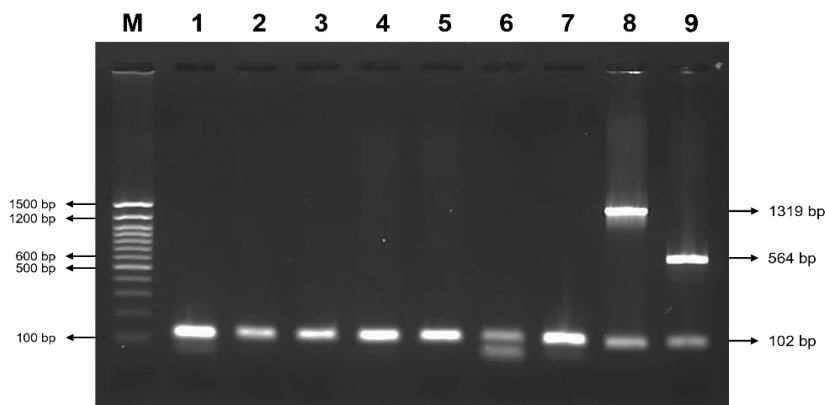


Ghi chú. Giếng M: Thang chuẩn DNA 100 bp; Giếng 1: Chứng nội ngoại sinh (102bp); Giếng 2: Singleplex PCR giữa genome vi khuẩn *Y. enterocolitica* với cặp mồi khuếch đại gen *sxy* (564bp); Giếng 3: Singleplex PCR giữa genome vi khuẩn *Y. enterocolitica* với cặp mồi khuếch đại gen *EX-sxy* (1,319bp). Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Phân tích kết quả PCR ở Hình 4, tất cả các giếng từ 1 đến 9 đều hiện diện vạch sáng của chứng nội ngoại sinh kích thước 102bp, chứng minh phản ứng PCR đã diễn ra hiệu quả và kết quả đáng tin cậy. Khi sử dụng hai cặp mồi YE-EX-sxy và YE-sxy để khuếch đại DNA từ các chủng vi khuẩn đối chứng (*S. enterica*, *B. cereus* và *L. monocytogenes*) ở giếng 2 đến giếng 7 thì không có bất kỳ vạch sáng nào ngoài vạch IC xuất hiện. Điều này chứng tỏ hai cặp mồi được thiết kế có độ đặc hiệu cao, không khuếch đại chéo với DNA của các loài vi khuẩn khác. Ngược lại, tại giếng 8 và 9, khi sử dụng DNA từ bộ gen *Y. enterocolitica*, các gen mục tiêu *EX-sxy* và *sxy* đã được khuếch đại thành công, tạo ra các vạch sản phẩm có kích thước lần lượt là 1,319bp và 564bp. Từ kết quả của phản ứng Singleplex PCR cũng như những kết quả này có thể khẳng định tính đặc hiệu và hiệu quả của các cặp mồi đã thiết kế cho vi khuẩn *Y. enterocolitica*.

Hình 4

Kết Quả Điện Di của Phản Ứng PCR với các Genome của Vi Khuẩn Đối Chứng



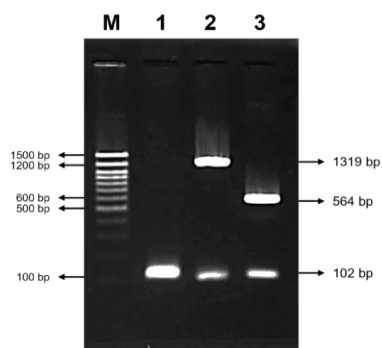
Ghi chú. Giếng M: Thang chuẩn DNA 100bp; Giếng 1: Chứng nội ngoại sinh (102bp); Giếng 2: PCR giữa genome vi khuẩn *S. enterica* với cặp mồi khuếch đại gen *EX-sxy*; Giếng 3: PCR giữa genome vi khuẩn *S. enterica* với cặp mồi khuếch đại gen *sxy*; Giếng 4: PCR giữa genome vi khuẩn *L. monocytogenes* với cặp mồi khuếch đại gen *EX-sxy*; Giếng 5: PCR giữa genome vi khuẩn *L. monocytogenes* với cặp mồi khuếch đại gen *sxy*; Giếng 6: PCR giữa genome vi khuẩn *B. cereus* với cặp mồi khuếch đại gen *EX-sxy*; Giếng 7: PCR giữa genome vi khuẩn *B. cereus* với cặp mồi khuếch đại gen *sxy*; Giếng 8: PCR giữa genome vi khuẩn *Y. enterocolitica* với cặp mồi khuếch đại gen *EX-sxy* (1,319bp); Giếng 9: PCR giữa genome vi khuẩn *Y. enterocolitica* với cặp mồi khuếch đại gen *sxy* (564bp). Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

3.6. Kết quả *in vitro* Nested PCR

Kết quả điện di của phản ứng *in vitro* Nested PCR ở Hình 5 cho thấy tại giếng 1 xuất hiện một vạch rõ nét, sáng, kích thước 102bp, tương ứng với chứng nội ngoại sinh theo như đã thiết kế. Giếng 2 hiển thị vạch sáng kích thước 1,319bp, khớp với sản phẩm khuếch đại của gen *EX-sxy* bằng bộ môi ngoài (YE-*EX-sxy*). Ở giếng 3 ghi nhận vạch sáng 564bp, tương ứng với sản phẩm khuếch đại gen *sxy* bởi bộ môi trong (YE-*sxy*). Đồng thời, sự hiện diện của băng IC 102bp tại cả giếng 2 và 3 khẳng định phản ứng PCR đã diễn ra hiệu quả và không có hiện tượng ức chế môi. Như vậy, các sản phẩm khuếch đại trong cả ba phản ứng đều đạt kích thước mong đợi và thể hiện các vạch rõ ràng, không lẫn mờ thừa hay sản phẩm không đặc hiệu.

Hình 5

Kết Quả Điện Di của Phản Ứng in Vitro Nested PCR



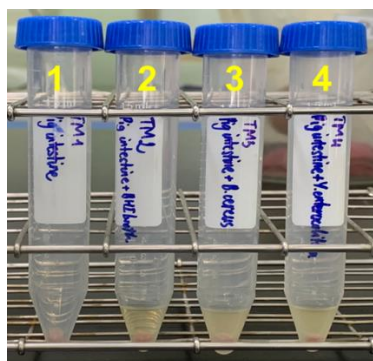
Ghi chú. Giếng M: Thang chuẩn DNA 100bp; Giếng 1: Chứng nội ngoại sinh (102bp); Giếng 2: PCR giữa genome vi khuẩn *Y. enterocolitica* với cặp môi khuếch đại gen *EX-sxy* (1,319bp); Giếng 3: *in vitro* Nested PCR (564bp). Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

3.7. Kết quả cảm nhiễm trên mẫu ruột heo

Sau khi xác định hiệu quả phát hiện *Y. enterocolitica* từ các cặp môi đã thiết kế trong điều kiện *in vitro*, nghiên cứu mở rộng sang điều kiện *ex vivo* nhằm mô phỏng tình huống nhiễm khuẩn tự nhiên trên vật chủ. Mẫu ruột heo được sử dụng để tiến hành thử nghiệm gây cảm nhiễm. Quy trình cảm nhiễm được thực hiện bằng cách ủ mẫu ruột heo trong ống falcon 15mL ở 37°C trong 02 giờ theo các nghiệm thức đã thiết kế. Sau đó, mẫu được lấy ra bằng kẹp, rửa sạch với dung dịch muối sinh lý 0.9%, rồi chuyển vào ống eppendorf 1.5mL. Quan sát trong suốt quá trình cảm nhiễm không ghi nhận bất kỳ thay đổi đáng kể nào về hình thái của mẫu ruột heo trước, trong và sau khi nhiễm (xem Hình 7).

Hình 6

Mẫu Ruột Heo được Gây Cảm Nhiễm theo 4 Nghiệm Thức



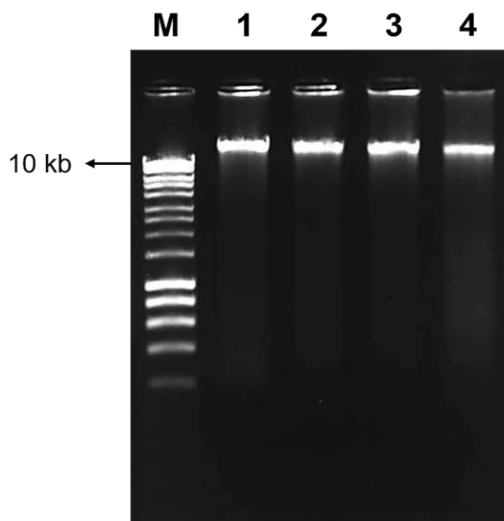
Ghi chú. 1: Mẫu ruột heo không nhiễm; 2: Mẫu ruột heo ủ trong môi trường BHI lỏng; 3: Mẫu ruột heo nhiễm vi khuẩn *B. cereus*; 4: Mẫu ruột heo nhiễm vi khuẩn *Y. enterocolitica*. Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

3.8. Kết quả tinh sạch genome từ các nghiệm thức gây cảm nhiễm

DNA từ các mẫu ruột heo thuộc 4 nghiệm thức được thu thập sau quá trình gây cảm nhiễm và tinh sạch bằng bộ kit DNeasy® Blood & Tissue Kit. Kết quả điện di được thể hiện rõ ở Hình 7 cho thấy cả 4 giếng đều hiển thị các vạch DNA sáng, lớn và rõ ràng, nằm phía trên vạch 1 kb của thang chuẩn DNA và không quan sát thấy dấu hiệu DNA bị phân mảnh. Điều này chứng tỏ DNA bộ gen thu được có chất lượng cao, nguyên vẹn và phù hợp để sử dụng làm khuôn mẫu cho các phản ứng Nested PCR tiếp theo trong nghiên cứu *ex vivo*.

Hình 7

Kết Quả Điện Di của Quá Trình Tinh Sạch Genome từ các Nghiệm Thức



Ghi chú. Giếng M: Thang chuẩn DNA 1 kb; Giếng 1: Genome mẫu ruột heo không nhiễm; Giếng 2: Genome mẫu ruột heo ủ trong môi trường BHI lỏng; Giếng 3: Genome mẫu ruột heo nhiễm vi khuẩn *B. cereus*; Giếng 4: Genome mẫu ruột heo nhiễm vi khuẩn *Y. enterocolitica*. Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Song song đó, để tối ưu hóa lượng mẫu cho các phản ứng PCR, các genome từ các nghiệm thức được xác định nồng độ DNA bằng phương pháp đo mật độ quang. Kết quả cho thấy nồng độ và độ tinh sạch của từng nghiệm thức được ghi nhận như sau: nghiệm thức 1 đạt 174 µg/mL với độ tinh sạch 1.90; nghiệm thức 2 đạt 156 µg/mL với độ tinh sạch 1.89; nghiệm thức 3 đạt 133.5 µg/mL với độ tinh sạch 1.82 và nghiệm thức 4 đạt 57 µg/mL với độ tinh sạch 1.81. Tất cả các mẫu đều nằm trong khoảng độ tinh sạch đạt yêu cầu lý tưởng cho DNA có độ tinh khiết cao. Điều này chỉ ra rằng mức độ tạp nhiễm protein hoặc các hợp chất có khả năng ức chế phản ứng là không đáng kể.

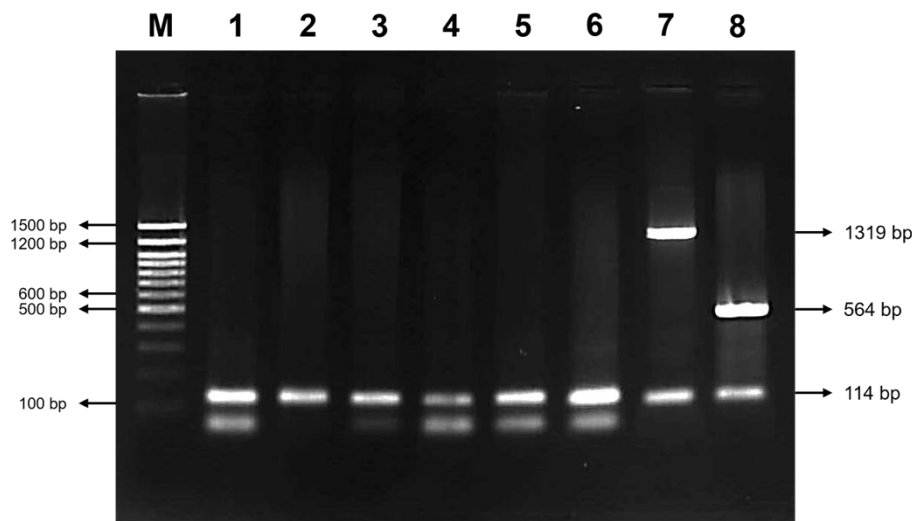
3.9. Kết quả *ex vivo* Nested PCR trên mẫu ruột heo

Kết quả Nested PCR *ex vivo*, sử dụng bộ gen tinh sạch từ các nghiệm thức gây cảm nhiễm, được trình bày tại Hình 8. Quan sát cho thấy tất cả các giếng đều có các vạch sáng, rõ nét tại vị trí dự kiến. Cụ thể, chứng nội nội sinh (Endogenous IC) đặc hiệu cho heo nhà (*Sus scrofa domestica*) đều xuất hiện ở tất cả các giếng với kích thước 114bp theo như đã thiết kế. Vai trò của Endogenous IC là kiểm soát quy trình tách chiết và tinh sạch DNA từ mẫu ruột heo cũng như quá trình phản ứng PCR. Tại các giếng từ 1 đến 6, không có sự xuất hiện của các vạch sản phẩm khuếch đại tương ứng với các cặp mồi YE-EX-sxy và YE-sxy. Một số giếng còn xuất hiện các vạch mờ nằm thấp hơn vạch IC, cho thấy sự hiện diện của mồi thừa. Điều này có thể được giải thích là do sự thiếu vắng khuôn mẫu DNA mục tiêu, ngăn cản các cặp mồi bám vào và khuếch đại dẫn đến dư thừa mồi. Ngược lại, tại giếng 7 có một vạch rõ nét kích thước 1,319bp

tương ứng với sản phẩm khuếch đại của gen *EX-sxy* bằng bộ mồi ngoài (YE-*EX-sxy*). Tương tự, tại giếng 8, một vạch kích thước 564 bp xuất hiện, tương ứng với sản phẩm khuếch đại của gen *sxy* bằng bộ mồi trong (YE-*sxy*).

Hình 8

Kết Quả Điện Di của Phản Ứng Ex Vivo Nested PCR



Ghi chú. Giếng M: Thang chuẩn DNA 100bp; Giếng 1: Mẫu ruột heo không nhiễm (PCR lần 1 với cặp mồi khuếch đại gen *EX-sxy*); Giếng 2: Mẫu ruột heo không nhiễm (PCR lần 2 với cặp mồi khuếch đại gen *sxy*); Giếng 3: Mẫu ruột heo ủ trong môi trường BHI lỏng (PCR lần 1 với cặp mồi khuếch đại gen *EX-sxy*); Giếng 4: Mẫu ruột heo ủ trong môi trường BHI lỏng (PCR lần 2 với cặp mồi khuếch đại gen *sxy*); Giếng 5: Mẫu ruột heo nhiễm vi khuẩn *B. cereus* (PCR lần 1 với cặp mồi khuếch đại gen *EX-sxy*); Giếng 6: Mẫu ruột heo nhiễm vi khuẩn *B. cereus* (PCR lần 2 với cặp mồi khuếch đại gen *sxy*); Giếng 7: Mẫu ruột heo nhiễm vi khuẩn *Y. enterocolitica* (PCR lần 1 với cặp mồi khuếch đại gen *EX-sxy*); Giếng 8: Mẫu ruột heo nhiễm vi khuẩn *Y. enterocolitica* (PCR lần 2 với cặp mồi khuếch đại gen *sxy*). Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Những kết quả trên không chỉ khẳng định phản ứng Nested PCR *ex vivo* đã được thực hiện thành công mà còn xác nhận tính đặc hiệu của hai gen *EX-sxy* và *sxy* đối với vi khuẩn *Y. enterocolitica*. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong việc phân biệt *Y. enterocolitica* với bộ gen của các vi khuẩn khác có thể đồng thời hiện diện và gây nhiễm trong các mẫu ruột heo, từ đó nâng cao độ tin cậy của phương pháp phát hiện.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã xác định thành công các gen đặc hiệu *EX-sxy* và *sxy* cho *Yersinia enterocolitica* và phát triển một phương pháp Nested PCR hiệu quả để phát hiện vi khuẩn này. Các cặp mồi được thiết kế cho gen *EX-sxy* (1,319bp) và gen *sxy* (564bp) đã chứng minh tính đặc hiệu trong các thử nghiệm *in vitro*, không khuếch đại với DNA của các chủng vi khuẩn đối chứng như *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* và *Bacillus cereus*. Mở rộng sang điều kiện *ex vivo* trên mẫu ruột heo nhiễm khuẩn, Nested PCR tiếp tục chứng minh hiệu quả với các vạch sáng khuếch đại các gen *EX-sxy* (1,319bp) và *sxy* (564bp) chỉ xuất hiện khi có sự hiện diện của *Y. enterocolitica*. Các nghiệm thức đối chứng không ghi nhận tín hiệu khuếch đại mục tiêu. Đồng thời, các mồi kiểm soát nội sinh (Exogenous IC 102bp và IC-SUS 114bp) hoạt động hiệu quả, đảm bảo độ tin cậy của quy trình. Như vậy, có thể khẳng định khả năng ứng dụng thực tiễn của phương pháp Nested PCR trong việc phát hiện *Y. enterocolitica* một cách đặc hiệu và hiệu quả trong cả điều kiện *in vitro* và *ex vivo*.

ĐÓNG GÓP KHOA HỌC

Bài báo xác định rõ khoảng trống nghiên cứu; bài báo mở rộng và bổ sung lý thuyết hiện có; bài báo phát triển phương pháp mới và cải tiến phương pháp hiện có; bài báo cung cấp bộ dữ liệu mới hoặc bằng chứng thực nghiệm mới; bài báo có ý nghĩa thống kê và thực tiễn rõ ràng; bài báo đưa ra hàm ý chính sách, quản trị và công nghệ; bài báo gợi mở các hướng nghiên cứu tiếp theo.

ĐÓNG GÓP TÁC GIẢ

CReditT: **Nguyễn Xuân Mai:** Phương pháp, Phần mềm, Thẩm định, Phân tích, Điều tra/Thí nghiệm, Tài nguyên, Quản lý dữ liệu, Hiệu đính, Trực quan hóa; **Phạm Đình Chương:** Xây dựng ý tưởng, Phương pháp, Thẩm định, Phân tích, Điều tra/Thí nghiệm, Tài nguyên, Quản lý dữ liệu, Viết bản thảo ban đầu, Hiệu đính, Trực quan hóa, Giám sát, Quản lý dự án, Huy động tài trợ.

TÀI TRỢ

Nghiên cứu này không nhận tài trợ từ bất kỳ nguồn bên ngoài nào.

TUYÊN BỐ KHÔNG CÓ XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả cam kết, tuyên bố không có bất kỳ xung đột lợi ích nào liên quan đến việc công bố bài báo này.

Tài liệu tham khảo

- Angelovska, M., Zaharieva, M., & Najdenski, H. (2023). *Yersinia enterocolitica* - Isolation, pathogenicity, and prevalence in farms for slaughtered pigs. *Acta Microbiologica Bulgarica*, 39(2), 118-129. <https://doi.org/10.59393/amb23390204>
- Barton, M. D. (2011). Pathogens in milk: *Yersinia enterocolitica*. In J. W. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences* (2nd ed., pp. 117-123). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00398-8>
- Cameron, A. D., Volar, M., Bannister, L. A., & Redfield, R. J. (2008). RNA secondary structure regulates the translation of *sxy* and competence development in *Haemophilus influenzae*. *Nucleic Acids Research*, 36(1), 10-20. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm915>
- Chlebicz, A., & Śliżewska, K. (2018). Campylobacteriosis, salmonellosis, yersiniosis, and listeriosis as zoonotic foodborne diseases: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), Article 863. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>
- Clark, W., & Christopher, K. (2000). An introduction to DNA: A spectrophotometry, degradation, and the "Frankengel" experiment. *Tested Studies for Laboratory Teaching*, 22, 81-99.
- Dang, S. X., Nguyen, H. V., Pham, P. D., Grace, D., Unger, F., Nguyen, N. H., Nguyen, T. T., & Makita, K. (2018). Simulating cross-contamination of cooked pork with *Salmonella enterica* from raw pork through home kitchen preparation in Vietnam. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(10), Article 2324. <https://doi.org/10.3390/ijerph15102324>

- Dash, H. R., Shrivastava, P., & Das, S. (2020). Quantification of DNA by Using UV-Visible Spectrophotometer. In *Principles and practices of DNA analysis: A laboratory manual for forensic DNA typing, springer protocols handbooks* (pp. 127-132). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0274-4_16
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). Isolation and quantification of DNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 403-414. <https://doi.org/10.1101/pdb.top093336>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), 175-178. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>
- Lorena, S. M., Cynthia, P. C., Isabela, A. R. M., Pamela, V. M., Gabriela, R. H., Jorge, B., & Mariano, G. (2023). Nucleic acids isolation for molecular diagnostics: Present and future of the silica-based DNA/RNA purification technologies. *Separation & Purification Reviews*, 52(3), 193-204. <https://doi.org/10.1080/15422119.2022.2053159>
- Luu, H. Q., Tran, H. T. T., Hoang, D. M., Nguyen, H. T. T., & Nguyen, H. T. T. (2020). Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Yersinia enterocolitica* trên lợn tại các cơ sở giết mổ ở địa bàn Hà Nội [Prevalence of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs in slaughterhouses in Hanoi]. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi*, 109, 51-59.
- Mesapogu, S., Jillepalli, C. M., & Arora, D. K. (2013). Agarose gel electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis: Methods and principles. In *Analyzing microbes, springer protocols handbooks* (pp. 73-91). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-34410-7_5
- Pal, M., Gutama, K. P., Girmay, G., Tewari, A., & da Silva Ruiz, L. (2023). Cultural and molecular techniques for the detection of *Yersinia enterocolitica* in food: An update. *Journal of Advances in Microbiology Research*, 4(1), 36-40.
- Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A short review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), 30-36. <https://doi.org/10.3329/akmmcj.v4i1.13682>
- Seitz, P., & Blokesch, M. (2013a). Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(3), 336-363. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00353.x>
- Seitz, P., & Blokesch, M. (2013b). DNA-uptake machinery of naturally competent *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(44), 17987-17992. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315647110>
- Sun, Y., Bernardy, E. E., Hammer, B. K., & Miyashiro, T. (2013). Competence and natural transformation in vibrios. *Molecular Microbiology*, 89(4), 583-595. <https://doi.org/10.1111/mmi.12307>
- Vandeventer, P. E., Lin, J. S., Zwang, T. J., Nadim, A., Johal, M. S., & Niemz, A. (2012). Multiphasic DNA adsorption to silica surfaces under varying buffer, pH, and ionic strength conditions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(19), 5661-5670. <https://doi.org/10.1021/jp3017776>

- Vandeventer, P. E., Mejia, J., Nadim, A., Johal, M. S., & Niemz, A. (2013). DNA adsorption to and elution from silica surfaces: Influence of amino acid buffers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(37), 10742-10749. <https://doi.org/10.1021/jp405753m>
- Wanger, A., Chavez, V., Huang, R. S. P., Wahed, A., Actor, J. K., & Dasgupta, A. (2017). Overview of molecular diagnostics principles. In *Microbiology and molecular diagnosis in pathology* (pp. 233-257). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805351-5.00012-0>
- Yamamoto, S., Izumiya, H., Mitobe, J., Morita, M., Arakawa, E., Ohnishi, M., & Watanabe, H. (2011). Identification of a chitin-induced small RNA that regulates translation of the *tfoX* gene, encoding a positive regulator of natural competence in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 193(8), 1953-1965. <https://doi.org/10.1128/JB.01340-10>

