

Nâng cao - tham khảo

GEN ĐỘC LỰC CỦA CÁC CHỦNG *PASTEURELLA MULTOCIDA* PHÂN LẬP TỪ LỢN Ở ASSAM

L. Babita Devi^{1,2}, Durlav Prasad Bora², S. K. Das²,
R. K. Sharma², S. Mukherjee³, R. A. Hazarika⁴

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu này được tiến hành nhằm phát hiện và xác định các gen độc lực của các chủng *Pasteurella multocida* phân lập từ lợn ở Assam (Ấn Độ).

Vật liệu và phương pháp: Tổng cộng có 21 chủng *P. multocida* phân lập từ lợn được phân nhóm dựa theo vỏ capsul và xác định các gen liên quan đến độc lực của vi khuẩn (*pfhA*, *tbpA*, *hgbB*, *toxA*, *oma87*, *ompH* và *nanB*) sử dụng các phương pháp PCR đã được công bố. Ngoài ra, độc lực của các chủng *P. multocida* còn được thử nghiệm trên chuột. Mỗi chủng *P. multocida* được chọn để thử độc lực được tiêm vào phúc xoang chuột (i/p) với 0,1ml canh trùng chứa 10^9 VK/ml.

Kết quả: Việc xác định serotype theo vỏ capsul của các chủng phân lập bằng multiplex PCR cho thấy có hai type, type A (66,66%) và type D (33,33%). Tất cả các chủng phân lập đều có gen protein màng ngoài, gen *oma87* và *ompH*. Các gen thu nhận sắt, *tbpA* và *hgbB*, được phát hiện ở 14,28% và 19,04% số chủng phân lập. Gen mã hóa dermonecrotxin, *toxA*, có mặt ở 23,80% số chủng phân lập. Gen mã hóa hemagglutinin dạng sợi, *pfhA*, được phát hiện ở 28,57% số chủng phân lập. Việc phát hiện các gen độc lực trên ở các chủng phân lập cho thấy vai trò quan trọng của các gen này trong cơ chế gây bệnh của vi khuẩn.

Kết luận: Từ nghiên cứu này, có thể kết luận rằng gen *toxA* là một gen quan trọng để xác định khả năng gây bệnh của các chủng *P. multocida* trên lợn.

Từ khóa: nhóm capsul, *Pasteurella multocida*, lợn, gen liên quan đến độc lực.

I. GIỚI THIỆU

Pasteurella multocida thuộc họ Pasteurellaceae là một vi khuẩn phổ biến, có ảnh hưởng đến nhiều loài vật chủ, gây ra một số bệnh như nhiễm trùng huyết xuất huyết ở trâu, bò, viêm phế quản ở bò, cừu và dê, viêm teo mũi ở lợn, dịch tả ở gia cầm và viêm mũi ở thỏ [1,2]. Vi khuẩn này là vi khuẩn Gram âm, là tác nhân gây bệnh cơ hội ở người và gia súc trên toàn thế giới.

Vi khuẩn này được chia thành 5 nhóm huyết thanh dựa theo vỏ capsul (A, B, D, E và F), gây ra các thể bệnh đặc trưng khác nhau và trên các loài vật chủ đặc hiệu [3]. Cả hai chủng độc tố và không độc tố của nhóm huyết thanh A và D đều liên quan đến các bệnh ở lợn [4]. Khả năng gây bệnh của *P. multocida* có liên quan đến nhiều yếu tố độc lực khác nhau bao gồm khả năng kết dính, độc tố

¹ KVK Churahandpur, Trung tâm ICAR Manipur, Ấn Độ

² Khoa Vi sinh vật, Đại học Thú y, Khanapara, Guwahati, Assam, Ấn Độ

³ Khoa Dược và dịch tễ thú y, Đại học Thú y, Mizoram, Ấn Độ

⁴ Khoa Thú y cộng đồng, Đại học Thú y, Khanapara, Guwahati, Assam, Ấn Độ

dermonecrotic, protein thu nhận sắt, sialidases và protein màng ngoài [3,5-7]. Những yếu tố độc lực này giúp cho việc xâm chiếm và xâm nhập vào vật chủ, tránh các cơ chế bảo vệ của vật chủ, gây tổn thương mô và kích thích phản ứng viêm của vật chủ. Sự kết hợp các yếu tố độc lực với các nhóm huyết thanh *P. multocida* cụ thể và tình trạng bệnh ở động vật cũng được báo cáo bởi Ewers et al. [8]. Do khả năng gây bệnh của *P. multocida* có thể được dự đoán bởi cả các độc tố và nhóm huyết thanh, việc đánh giá các yếu tố độc lực này là quan trọng.

Nghiên cứu này nghiên cứu các gen liên quan đến độc lực (VGA) của các chủng *P. multocida* phân lập từ lợn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi sử dụng trong phản ứng PCR đa mồi xác định serotype và gen độc lực của vi khuẩn *P. multocida*

Gen	Mồi	Trình tự mồi (5'-3')	Kích thước sản phẩm	Tham khảo
KMT1	KMT1T7 Fwd KMT1SP6 Rev	ATCCGCTATTTACCCAGTGG GCTGTAAACGAACTCGCCAC	460 bp	Townsend et al. [9]
<i>hyaD-hyaC</i>	CAPA Fwd CAPA Rev	TGCCAAAATCGCAGTCAG TTGCCATCATTGTCAGTG	1044 bp	Townsend et al. [10]
<i>bcbD</i>	CAPB Fwd CAPB Rev	CATTTATCCAAGCTCCACC GCCCGAGAGTTTCAATCC	760 bp	Townsend et al. [10]
<i>dcbF</i>	CAPD Fwd CAPD Rev	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657 bp	Townsend et al. [10]
<i>toxA</i>	Forward Reverse	TCT TAG ATG AGC GAC AAG G GAA TGC CAC ACC TCT ATA G	846 bp	Shayegh et al. [11]
<i>hgbB</i>	Forward Reverse	TCT TTG AGT ACG GCT TGA C CTT ACG TCA GTA ACA CTC G	540 bp	Shayegh et al. [11]
<i>tbpA</i>	Forward Reverse	TGG TTG GAA ACG GTAAAG C TAA CGT GTA CGG AAA AGC C	728 bp	Shayegh et al. [11]
<i>pfhA</i>	Forward Reverse	AGC TGA TCA AGT GGT GAA C TGG TAC ATT GGT GAA TGC TG	275 bp	Shayegh et al. [11]
<i>nanB</i>	Forward Reverse	CAT TGC ACC TAA CAC CTC T GGA CAC TGA TTG CCC TGAA	555 bp	Tang et al. [12]; Ewer et al. [7]
<i>Oma87</i>	Forward Reverse	GGC AGC GAG CAA CAG ATA ACG TGT TCG TCA AAT GTC GGG TGA	838 bp	Tang et al. [12]; Ewer et al. [7]
<i>ompH</i>	Forward Reverse	GCG TTT CAT TCA AAG CAT CTC ATG ACC GCG TAA CGA CTT TC	1000 bp	Luo et al. [13]

P. multocida=*Pasteurella multocida*

2.1. Tiêu chuẩn đạo đức

Tiêu chuẩn đạo đức của nghiên cứu này dựa trên quy định của IAEC, trường Đại học Nông nghiệp Assam (AAU), số 770/ac/CPCSEA/ FVSc/ AAU/IAEC/10-11/79 ngày 09.09.2011.

2.2. Nguồn gốc các chủng *P. multocida* phân lập

21 chủng *P. multocida* phân lập sử dụng trong nghiên cứu này được giữ giống trong chương trình Dự án Mạng lưới ICAR về bệnh xuất huyết nhiễm trùng huyết, Khoa Vi sinh vật, Đại học Thú y, Đại học Nông nghiệp Assam, Khanapara, Guwahati. Chủng tham chiếu (P52) được cung cấp bởi Khoa Vi khuẩn và Nấm mốc, Viện Nghiên cứu Thú y ICAR-Ấn Độ, Izatnagar, Bareilly, Uttar Pradesh.

2.3. Kiểm tra các chủng *P. multocida*

Các chủng phân lập được xác định lại bằng các kỹ thuật kiểm tra vi khuẩn học thường quy và phản ứng PCR đặc hiệu loài *P. multocida* (PM-PCR) theo phương pháp được mô tả bởi Townsend et al. [9] sử dụng các cặp mồi đặc hiệu (bảng 1) [7, 9-13]. PCR được thực hiện trong hỗn hợp phản ứng 25 µl (3,0 µl DNA, 12,5 µl master mix (2X, Qiagen, Đức), mồi xuôi và mồi ngược, 10 pmol/mồi). Chu trình nhiệt gồm các bước tiền

biến tính ở 94°C trong 4 phút, 35 chu kỳ 94°C trong 45 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 45 giây, và kéo dài ở 72°C trong 6 phút.

2.4. Xác định serotype theo vỏ capsul

Xác định type theo vỏ capsul của tất cả các chủng được thực hiện bằng phương pháp PCR đa mồi theo mô tả của Townsend et al. [10] với điều kiện phản ứng như minh họa trong bảng 2 [7, 11].

Bảng 2. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Các giai đoạn	Gen						
	tox A	tbp A	hgb B	pfh A	omp H	oma87	nan B
Tiền biến tính	95°C	95°C	95°C	95°C	94°C	94°C	94°C
Biến tính	5 phút	5 phút	5 phút	5 phút	3 phút	3 phút	3 phút
	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C	94°C
Bắt cặp	45 giây	45 giây	45 giây	45 giây	30 giây	30 giây	30 giây
	54°C	54°C	54°C	54°C	57°C	55°C	56°C
Kéo dài	50 giây	50 giây	50 giây	50 giây	30 giây	30 giây	30 giây
	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C	72°C
Số chu kỳ	50 giây	50 giây	50 giây	50 giây	60 giây	60 giây	45 giây
Số chu kỳ	35	35	35	35	25	25	30
Kết thúc	72°C 10 phút						
Giữ	4°C						

2.5. Xác định gen độc lực

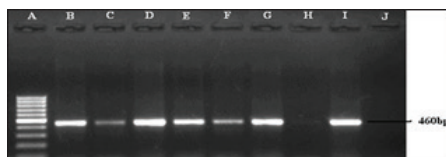
Các chủng *P. multocida* được kiểm tra các gen VGA (*pfhA*, *tbpA*, *hgbB*, *toxA*, *oma87*, *ompH* và *nanB*) theo phương pháp PCR đơn mồi của Ewers et al. [8], sử dụng các cặp mồi đặc hiệu (bảng 1) theo chu trình nhiệt như trình bày ở bảng 2. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di trên agarose gel 1,5% trong 1X tris acetate EDTA ở 60V trong 1 giờ, nhuộm ethidium bromide, kiểm tra dưới tia UV sử dụng hệ thống Gel Documentation System (Kodak, Biostep, Germany).

2.6. Xác định độc lực của các chủng *P. multocida* phân lập được

Độc lực của các chủng *P. multocida* được kiểm tra trên chuột theo phương pháp của Curtis [14]. Canh trùng của mỗi chủng *P. multocida* kiểm tra được tiêm cho một lô chuột, đường tiêm phúc xoang, liều tiêm 0,1 ml canh trùng ở nồng độ 10^9 vi khuẩn/ml [15].

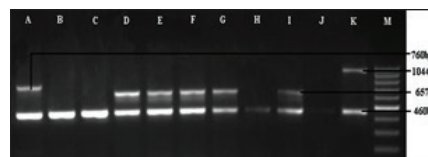
III. KẾT QUẢ

Tất cả các chủng vi khuẩn được tăng sinh trên môi trường thạch máu. Các khuẩn lạc nhỏ, mịn, tròn, sáng lấp lánh như giọt sương, có mùi đặc trưng và không gây dung huyết, Gram âm, dạng cầu khuẩn được xác định là *P. multocida*. Các chủng này được kiểm tra thêm bằng phản ứng PCR đặc hiệu loài, sử dụng cặp mồi KMT1 cho kích thước sản phẩm 460bp (hình 1).



Hình 1. Phản ứng PCR xác định gen KMT1 (460 bp) đặc hiệu cho loài *P. multocida*

Giếng A: thang chuẩn 100bp. Giếng B đến H: chủng dương tính với gen KMT. Giếng J: đối chứng âm

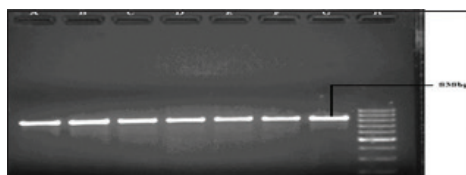


Hình 2. Phản ứng PCR đa mồi xác định serotype của *P. multocida*

Giếng A: chủng tham chiếu (P52). Giếng D, E, F, G và I: chủng dương tính với cặp mồi cap D. Giếng K: chủng dương tính với cặp mồi cap A. Giếng M: thang chuẩn 100bp

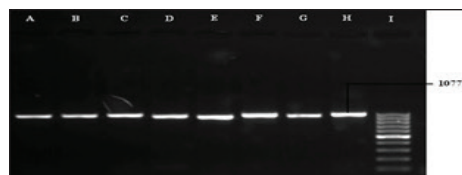
Kết quả định type capsul 21 chủng *P. multocida* trên bằng phương pháp PCR: có 7 chủng thuộc serotype D (kích thước sản phẩm PCR là 657 bp, hình 2) (chiếm tỷ lệ 33,33%), 14 chủng thuộc serotype A (kích thước sản phẩm PCR là 1044bp, hình 2) (chiếm tỷ lệ 66,66%). Chủng tham chiếu cho kích thước sản phẩm PCR là 760 bp, thuộc serotype B.

Phát hiện gen độc lực bằng PCR (bảng 3), tất cả 21 chủng *P. multocida* sử dụng trong nghiên cứu này và chủng tham chiếu đều có gen màng ngoài *oma87* (kích thước sản phẩm là 838 bp) và *ompH* (kích thước sản phẩm là 1077 bp) (hình 3 và 4). Gen liên kết với hemoglobin (*hgbB*, hình 5) được phát hiện ở 4 chủng thuộc serotype D (57,14%), gen *tbpA* (hình 6) được phát hiện ở 4 chủng thuộc serotype A (21,42%).



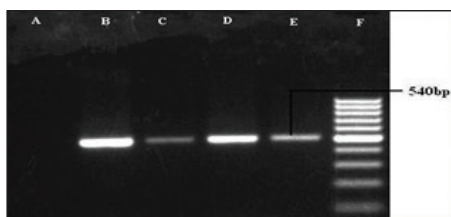
Hình 3. Phản ứng PCR xác định gen *oma87* (838 bp) của vi khuẩn *P. multocida*

Giếng A đến G: chủng dương tính với gen *oma87*. Giếng H: thang chuẩn 100bp



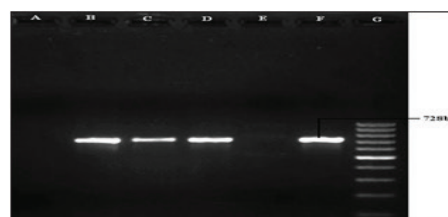
Hình 4. Phản ứng PCR xác định gen *ompH* (1077 bp) của vi khuẩn *P. multocida*

Giếng A đến H: chủng dương tính với gen *ompH*, giếng I: thang chuẩn 100bp



Hình 5. Phản ứng PCR xác định gen *hgbB* (540 bp) của vi khuẩn *P. multocida*

Giếng A: chủng âm tính với gen *hgbB*, giếng B, C, D và E: chủng dương tính với *hgbB*, giếng F: thang chuẩn 100bp.



Hình 6. Phản ứng PCR xác định gen *tbpA* (728 bp) của vi khuẩn *P. multocida*

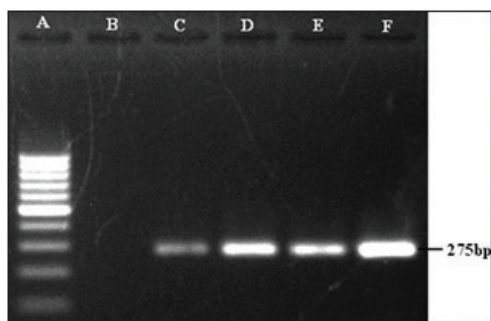
Giếng B, C, D và F: chủng dương tính với gen *tbpA*. Giếng A và E: chủng âm tính với gen *tbpA*. Giếng G: thang chuẩn 100bp.

Bảng 3. Gen độc lực của các serotype *P. multocida* khác nhau phân lập từ lợn và khả năng gây độc trên chuột thí nghiệm

TT	Chủng phân lập	Serotype	Gen độc lực							Độc lực trên chuột
			tox _A	nan _B	tlp _A	pfh _A	hgb _B	oma ₈₇	omp _H	
1	P2	A						+	+	83,33
2	P3	A						+	+	
3	P4	A						+	+	66,66
4	P6	A						+	+	83,33
5	P16	A						+	+	
6	P19	A						+	+	
7	P20	A						+	+	
8	P22	A						+	+	50
9	P5	A				+		+	+	83,33
10	P7	A				+		+	+	
11	P13	A				+		+	+	
12	P14	A	+		+	+		+	+	100
13	P18	A	+		+	+		+	+	83,33
14	P10	A	+		+			+	+	100
Tổng		14	3 (21,42)	0	3 (21,42)	5 (35,71)	0	14 (100)	14 (100)	8 (57,14)
15	P1	D						+	+	
16	P9	D						+	+	
17	P15	D	+	+			+	+	+	100
18	P17	D					+	+	+	
19	P21	D					+	+	+	50
20	P8	D		+				+	+	33,33
21	P11	D	+			+	+	+	+	100
Tổng		7	2 (28,57)	2 (28,57)	0	1 (14,28)	4 (57,14)	7 (100)	7 (100)	4 (57,14)
22	P12	B (P52)	0	0	1	1	0	1	1	100
Tổng cộng		22	5 (22,72)	2 (9,09)	4 (18,18)	7 (31,81)	4 (18,18)	22 (100)	13 (59,09)	

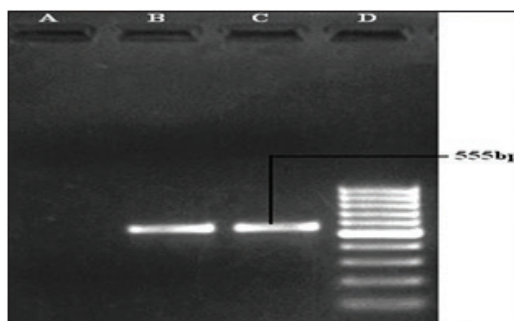
Trên PCR phát hiện gen độc lực (bảng 3), người ta nhận thấy rằng các gen màng ngoài (*oma87* và *ompH*) được tìm thấy có mặt trong tất cả 21 chủng phân lập từ lợn được sử dụng trong nghiên cứu này và kích thước của sản phẩm tương ứng là 838 bp và 1077 bp (hình 3 và 4). Gen liên kết hemoglobin (*hgbB*, hình 5) được tìm thấy trong 4 phân lập (57,14%) thuộc serotype D, trong khi gen *tlpA* (hình 6) chỉ được

phát hiện ở 4 chủng (21,42%) thuộc serotype A. Kết quả kiểm tra gen *pfhA* của 21 chủng vi khuẩn, có sáu chủng cho kết quả dương tính (kích thước sản phẩm PCR là 275 bp, hình 7), trong đó có 5 chủng serotype A (35,71%) và 1 chủng serotype D (14,28%). Gen mã hóa sialidase (*nanB*) chỉ được phát hiện ở 2 (28,57%) chủng phân lập thuộc serotype D (hình 8).



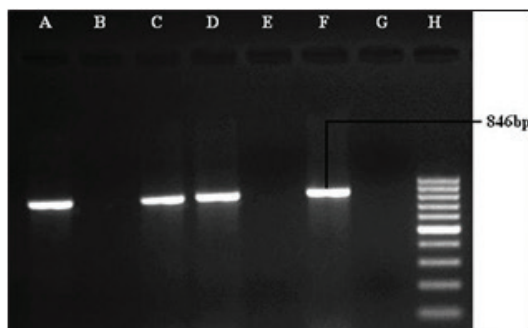
Hình 7. Phản ứng PCR xác định gen *pfhA* (275 bp) của vi khuẩn *P. multocida*

Giếng A: thang chuẩn 100bp. Giếng B: chủng âm tính với gen *pfhA*, giếng C đến F: chủng dương tính với gen *pfhA*.



Hình 8. Phản ứng PCR xác định gen *nanB* (555 bp) của vi khuẩn *P. multocida*

Giếng A: chủng âm tính với *nanB*. Giếng B và C: chủng dương tính với *nanB*. Giếng D: thang chuẩn 100bp.



Hình 9. Phản ứng PCR xác định gen *toxA* (846 bp) của vi khuẩn *P. multocida*

Giếng A, C, D và F: chủng dương tính với gen *toxA*. Giếng B, E và G: chủng âm tính với gen *toxA*. Giếng H: thang chuẩn 100bp.

Gen độc tính (*toxA*) đã được phát hiện ở 5 chủng vi khuẩn, trong đó có 3 chủng là serotype A (21,42%), 2 chủng là serotype D (28,57%). Gen *toxA* không có trong chủng vi khuẩn tham chiếu P52 (hình 9).

IV. THẢO LUẬN

Bài viết này là nghiên cứu đầu tiên về các gen độc lực của vi khuẩn *P. multocida* phân lập từ lợn ở Assam (Ấn Độ). Pasteurellosis là một bệnh thường gặp ở lợn trên phạm vi toàn cầu, với các serotype đặc trưng và thường liên quan tới các bệnh đường hô hấp ở lợn [16-18]. Tuy nhiên, sự phân bố của các serotype có thể rất khác nhau giữa các vùng địa lý và khác nhau theo thời gian tại

cùng một khu vực [12, 19]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tỷ lệ các chủng serotype A cao hơn so với serotype D. Các chủng phân lập được thường từ các ca bệnh đường hô hấp ở lợn. Một số nghiên cứu ở khu vực trung tâm Kalorey et al. [20] và Đông Bắc Ấn Độ [19,21] cũng công bố kết quả xác định tỷ lệ serotype A cao hơn serotype D ở *P. multocida* phân lập từ lợn. Sự thay đổi về phân bố của các gen độc lực giữa các serotype của *P. multocida* trong nghiên cứu này cũng đã được ghi nhận (bảng 3). Tuy nhiên, không có mối tương quan nào giữa sự có mặt của các gen độc lực với sự phân bố rộng rãi của các serotype. Sự phân bố rộng rãi của gen *hgbB* giữa các chủng *P. multocida* và thường gặp ở các chủng thuộc serotype D hơn

so với các chủng thuộc serotype A cũng đã được báo cáo [7, 22]. Trái với kết quả của chúng tôi về gen *tbpA*, Ewers et al. [7] chỉ phát hiện gen này ở các chủng phân lập từ trâu, bò và cừu chứ không gặp ở các chủng phân lập từ lợn. Theo kết quả nghiên cứu này, có 18,18% số chủng phân lập có gen *tbpA* có thể là do sự lây truyền giữa các gen của các chủng *P. multocida*, Kumar et al. [23] cũng đã đưa ra nhận xét tương tự. Tuy nhiên, cần nghiên cứu thêm trước khi đưa ra kết luận về sự lây truyền giữa các loài.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ dương tính của gen *pfhA* ở các chủng thuộc serotype D thấp hơn serotype A cũng tương đồng với các công bố khác về mối liên quan của gen này với các nhóm huyết thanh A, B, E và F [7,12, 22].

Sự xuất hiện của gen *OMP* trong các chủng *P. multocida* của lợn và sự phân bố đồng đều giữa các nhóm huyết thanh (serotype A, serotype D và các serotype khác) cũng được báo cáo [7,12,22]. Các *OMP* của *P. multocida* đã được xác định là các chất gây miễn dịch mạnh [24] như báo cáo của Rajkhowa et al. [25] và đóng một vai trò quan trọng trong cơ chế sinh bệnh của bệnh tụ huyết trùng [26]. Hazarika et al. [27] cũng báo cáo rằng vaccin tiểu phần và vaccin toàn khuẩn được điều chế từ các chủng *P. multocida* phân lập từ lợn có khả năng bảo hộ 100% kháng lại các chủng tương đồng cũng như dị hợp so với vaccin chế từ chủng vi khuẩn tham chiếu (P52, tỷ lệ bảo hộ lần lượt là 66,66 và 86,66%). Từ nghiên cứu hiện tại, có thể thấy rằng gen *OMP* có vai trò lớn trong sinh bệnh học của bệnh do *P. multocida* không liên quan đến các serotype khác nhau. Xem xét khả năng sinh miễn dịch của các gen *OMP*, cả hai gen đều có thể được sử dụng trong quá trình phát triển một loại vaccin phù hợp kháng lại bệnh tụ huyết trùng ở lợn. Tuy nhiên, trước khi đưa ra bất kỳ kết luận nào về sự phân bố và khả năng sử dụng để sản xuất vaccin, cần tiến hành một nghiên cứu sâu hơn với số lượng chủng vi khuẩn nhiều hơn, thu thập từ các khu vực khác nhau của vùng Đông Bắc.

13 (59,09%) chủng vi khuẩn gây bệnh đều có các tổ hợp gen độc lực khác nhau. Chủng thuộc serotype A với các tổ hợp gen độc lực khác nhau có

tỷ lệ gây chết chuột là 83,33-100% khi so sánh với các chủng chỉ có gen *OMP* (50-83,33%). Tương tự như vậy, serotype D với sự kết hợp gen độc lực khác nhau có tỷ lệ gây chết chuột là 33,33-100%. Hiện nay, chưa có báo cáo nào về sự liên quan giữa các gen độc lực của vi khuẩn *P. multocida* với khả năng gây bệnh của chúng ở chuột.

Tuy nhiên, có thể thấy rõ rằng *OMP* không đóng vai trò chính trong cơ chế sinh bệnh của vi khuẩn *P. multocida*, mà sự liên quan của các *VGA* khác với gen *OMP* mới đóng vai trò quan trọng. Nghiên cứu hiện tại chỉ ra rằng gen *toxA* đóng vai trò quan trọng trong sinh bệnh học của *P. multocida* ở lợn, tương tự với kết quả của nhiều nghiên cứu khác [28-30]. Trong số các gen độc lực còn lại, gen *tbpA* đã được tìm thấy có liên quan chặt chẽ với sinh bệnh học của *P. multocida*. Trái với kết quả của chúng tôi, Ewers et al. [7] đã công bố gen *tbpA* chỉ có trong các chủng *P. multocida* của bò và không thể phát hiện ở các chủng phân lập từ lợn. Mặc dù họ quan sát thấy mối liên quan đáng kể giữa *pfhA* và *toxA* ở lợn có các triệu chứng bệnh trên lâm sàng, nhưng *toxA* được cho là có liên quan đến tình trạng bệnh một cách tự nhiên.

Một bài viết tổng hợp cho rằng không có báo cáo nào về việc phát hiện gen *tbpA* từ các chủng phân lập từ lợn, việc phát hiện gen này ở các chủng có độc lực cao phân lập từ lợn là một phát hiện quan trọng, và vai trò của nó trong cơ chế sinh bệnh học cần được nghiên cứu thêm. Trong nghiên cứu này, một số chủng *P. multocida* không gây chết chuột, khi chỉ tiêm 1 chủng đó hoặc tiêm kết hợp với chủng *P. multocida* có mang gen độc lực. Điều này có thể là do sự cấy chuyển nhiều lần trong phòng thí nghiệm dẫn đến việc ức chế chức năng gen hoặc do đột biến gen, dẫn đến không biểu hiện gen *in vivo* [31,32]. Việc phát hiện một tỷ lệ cao chủng *P. multocida* serotype A từ lợn cũng được báo cáo bởi các nghiên cứu khác [11, 20, 30, 33]. Phát hiện gen độc tố ở cả hai serotype A và D của *P. multocida* trong nghiên cứu này cho thấy vai trò quan trọng của nó trong cơ chế sinh bệnh học.

V. KẾT LUẬN

Từ nghiên cứu này, có thể kết luận rằng gen *toxA* là một gen chỉ điểm quan trọng để xác định khả năng gây bệnh của các chủng *P. multocida* ở lợn. Tuy nhiên, các gen độc lực khác cũng được tìm thấy ở các chủng *P. multocida* gây bệnh. Trong số các gen độc lực còn lại, gen *tbpA* đã được tìm thấy có liên quan chặt chẽ với cơ chế sinh bệnh của *P. multocida*. Sự liên kết của các gen trong cơ chế gây bệnh cần được đánh giá thêm.

Đóng góp của nhóm tác giả: Nghiên cứu này là một phần của luận văn tiến sĩ của LBD. LBD đã thực hiện thí nghiệm. SKD, RKS và DPB đã thiết kế thí nghiệm. SKD, RKS, DPB, SM và RAH cung cấp các hướng dẫn cần thiết. DPB đã chỉnh sửa bản thảo cuối cùng. Tất cả các tác giả đã đọc và chấp thuận bản thảo cuối cùng.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin cảm ơn Hội đồng nghiên cứu nông nghiệp Ấn Độ (ICAR) đã trợ giúp tài chính để thực hiện nghiên cứu trong Dự án mạng lưới về các bệnh xuất huyết (NWP trên HS), số hiệu dự án F.No 1 (23) / 02-IA-I ngày 9 tháng 2 năm 2004.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hatfaludi, T., Al-Hasani, K., Boyce, J.D. and Adler, B. (2010) Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, 144: 1-17.
2. Sarangi, L.N., Priyadarshini, A., Kumar, S., Thomas, P., Gupta, S.K., Nagaleekar, V.K. and Singh, V.P. (2014). Virulence genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from multiple hosts from India. *Sci. World J.*, 2014: 1-10.
3. Harper, M., Boyce, J.D. and Adler, B. (2006). *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol. Lett.*, 265: 1-10.
4. Ujvári, B., Szeredi, L., Pertl, L., Tóth, G., Erdélyi, K.K., János, S., Molnár, T. and Magyar, T. (2015) First detection of *Pasteurella multocida* Type B: 2 in Hungary associated with systemic pasteurellosis in backyard pigs. *Acta Vet. Hung.* 63: 141-156.
5. Hunt, M.L., Adler, B. and Townsend, K.M. (2000) The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, 72: 3-25.
6. Hunt, M.L., Boucher, D.J., Boyce, J.D. and Adler, B. (2001). *In vivo*-expressed genes of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.*, 69: 3004-3012.
7. Ewers, C., Lübbe-Becker, A., Bethe, A., Kiebling, S., Filter, M. and Wieler, L.H. (2006) Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet. Microbiol.*, 114: 304-317.
8. Ewers, C., Lübbe-Becker, A. and Wieler, L.H. (2004) *Pasteurella*: Insights into the virulence determinants of a heterogenous bacterium. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 9-10: 367-386.
9. Townsend, K.M., Frost, A.J., Lee, C.W., Papadimitriou, J.M. and Dawkins, H.J. (1998) Development of PCR assays for species and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 1096-1100.
10. Townsend, K.M., Boyce, J.D., Chung, J.Y.A., Frost, J. and Adler, B. (2001) Genetic organization of *Pasteurella multocida* *cap* loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 924-929.
11. Shayegh, J., Atashpaz, S. and Hejazi, M.S. (2008). Virulence genes profile and typing of ovine *Pasteurella multocida*. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, 3: 206-213.
12. Tang, X., Zhao, Z., Hu, J., Wu, B., Cai, X., He, Q. and Chen, H. (2009). Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from Swine in China. *J. Clin. Microbiol.*, 47: 951-958.
13. Luo, Y., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Hancock, R.E., Bains, M., Cheng, I.H. and Wang, C. (1997). Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (*ompH*) of *Pasteurella multocida* X-73. *J. Bacteriol.*, 179: 7856-7864.
14. Curtis, P.E. (1985) *Pasteurella multocida*. In: Collins, C.H., Grange, J.M., editors. Isolation and Identification of Microorganisms of Medical and Veterinary Importance. Academic Press, London.
15. Wijewardana, T.G. (1992) Haemorrhagic septicaemia. Diagnostic and Vaccine Production Procedures. FAO Regional Reference Laboratory (Asian Region). Veterinary Research Institute, Department of Animal Production &

- Health, Paradeniya, Sri Lanka.
16. Pors, S.E., Hansen, M.S., Bisgaard, M., Jensen, H.E. and Iburg, T.M. (2013) Immuno histochemical study of porcine lung lesions associated with *Pasteurella multocida*. *Vet. J.*, 197: 483-488.
17. Tigga, M., Ghosh, R.C., Malik, P., Choudhary, B.K., Tigga, P. and Nagar, D.K. (2014) Isolation, characterization, antibiogram and pathology of isolated from pigs. *Vet. World*, 7: 363-368.
18. Choudhary, M., Ghosh, R.C., Malik, P., Choudhary, B.K. and Nety, S. (2017) Pathological changes associated with natural outbreak of swine pasteurellosis. *J. Pure Appl. Microbiol.*, 11: 237-240.
19. Varte, Z., Dutta, T.K., Roychoudhury, P., Begum, J. and Chandra, R. (2014) Isolation, identification, characterization and antibiogram of *Pasteurella multocida* isolated from pigs in Mizoram with special reference to progressive atrophic rhinitis. *Vet. World*, 7: 95-99.
20. Kalorey, D.R., Yuvaraj, S., Vanjari, S.S., Gunjal, P.S., Dhanawade, N.B., Barbuddhe, S.B. and Bhandarkar, A.G. (2008) PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from an outbreak of pasteurellosis in Indian pigs. *J. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 31: 459-465.
21. George, S., Rajbongshi, G., Deuri, S., Khatoon, A. and Barman, N.N. (2012) Simultaneous occurrence of pneumonic pasteurellosis and swine fever in an organised pig farm in Assam. *North East Vet.*, 12: 5-8.
22. Bethe, A., Wieler, L.H., Selbitz Hans, J. and Ewers, C. (2009) Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine. *Vet. Microbiol.*, 139: 97-105.
23. Kumar, H., Mahajan, V., Sharma, S., Alka., Singh, R., Arora, A.K., Banga, H.S., Verma, S., Kaur, K., Kaur, P. and Meenakshi Sandhu, K.S. (2007) Concurrent pasteurellosis and classical swine fever in Indian pigs. *J. Swine Health. Prod.*, 15: 279-283.
24. Singh, R., Tewari, K., Packiriswamy, N., Marla, S. and Rao, V.D.P. (2011) Molecular characterization and computational analysis of the major outer membrane protein (*ompH*) gene of *Pasteurella multocida* p52. *Vet. Arhiv.*, 81: 211-222.
25. Rajkhowa, S., Shakuntala, I., Pegu, S.R., Das, R.K. and Das, A. (2012) Detection of *Pasteurella multocida* isolates from local pigs of India by polymerase chain reaction and their antibiogram. *Trop. Anim. Health Prod.*, 44: 1497-1503.
26. Srivastava, S.K. (1998) Outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype B: 2 are immunogenic and antiphagocytic. *Ind. J. Exp. Biol.*, 36: 530-532.
27. Hazarika, M.P., Barman, N.N., George, S. and Sharma, R.K. (2011) Characterization of *Pasteurella multocida* isolated from pneumonic pigs of Assam. *Indian J. Anim. Res.*, 44: 265-269.
28. Jong, M.F. (2006). In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., d'Al-laire, S., Taylor, D.J., editors. Diseases of Swine. 9th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. p577-602.
29. Martineau, G.P., Broes, A. and de Jong, M.F. (1982) Experimental reproduction of atrophic rhinitis with *Pasteurella multocida* on gnotobiotic and conventional piglets. *Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong.* (Subject Rhinitis). 6: 88.
30. Rutter, J.M. and Rojas, X. (1982) Atrophic rhinitis in gnotobiotic piglets: Differences in the pathogenicity of *Pasteurella multocida* in combined infection with *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Rec.*, 110: 531-535.
31. Borowski, S.M., Silva, S.C., Schrank, I. and Cardoso, M. (2001) Toxin detection in *Pasteurella multocida* strains isolated from swine lungs in the state of Rio Grande do Sul Brazil. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, 29: 79-85.
32. Stępniewska K. and Markowska-Daniel, I. (2013) Phenotypic and genotypic characterization of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.*, 57: 29-3.
33. Cardoso, T.F., Laguna, G.J., Callejo, M., Vela, A.I., Carrasco, L., Fernandez, G.J.F., Maldonado, A. and Luque, I. (2013) Septicaemic pasteurellosis in free-range pigs associated with an unusual biovar 13 of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, 167: 690-694.

Lưu Thị Hải Yến - Viện Thú y dịch từ "Virulence gene profiling of porcine *Pasteurella multocida* isolates of Assam", *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916, pp.348-354.