

TỶ LỆ LƯU HÀNH MỘT SỐ GEN ĐỘC LỰC TRÊN CÁC CHỦNG *YERSINIA ENTEROCOLITICA* PHÂN LẬP TỪ LỢN TẠI LÒ MỔ Ở HÀ NỘI

Luu Quỳnh Hương, Trần Thị Thu Hằng,
Lê Thị Hồng Nhung, Nguyễn Thị Thu Hằng
Viện Thú y

TÓM TẮT

Yersinia enterocolitica là vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm phổ biến ở các nước phát triển, sau *Campylobacter* và *Salmonella*. Đây là tác nhân gây bệnh Yersiniosis, một bệnh truyền lây giữa người và động vật. Nghiên cứu này nhằm bước đầu xác định sự có mặt của các gen độc lực trong các chủng *Yersinia enterocolitica*. 20 chủng *Yersinia enterocolitica* phân lập từ lợn tại cơ sở giết mổ ở Hà Nội đã xác định được sự có mặt của một số gen độc lực (*ail*, *inv*, *ystA*, *ystB* và *yadA*) bằng kỹ thuật PCR. Kết quả là 80% các chủng mang gen *ail*, 60% mang gen *ystA*, 50% mang gen *inv*, 45% mang gen *yadA* và chỉ có 10% mang gen *ystB*. Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các chủng gây bệnh không nhất thiết phải mang đầy đủ các gen độc lực và các chủng không gây bệnh cũng có sự hiện diện của một số yếu tố độc lực.

Từ khóa: *Yersinia enterocolitica*, PCR, *ail*, *inv*, *ystA*, *ystB*, *yadA*.

Prevalence of virulence genes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pig at slaughterhouses in Ha Noi

Luu Quynh Hương, Tran Thi Thu Hang,
Le Thi Hong Nhung, Nguyen Thi Thu Hang

SUMMARY

Yersinia enterocolitica is a bacteria causes food poisoning commonly in the developed countries, standing after *Campylobacter* and *Salmonella*. It is the causative agent of yersiniosis, a zoonotic disease. The purpose of this study was to initially determine the presence of virulent genes in the *Yersinia enterocolitica* strains. 20 strains of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs at the slaughterhouses in Ha Noi were determined for the presence of some virulent genes (*ail*, *inv*, *ystA*, *ystB* and *yadA*) by PCR technique. As a result, 80% of strains carried *ail* gene, 60% of strains carried *ystA* gene, 50% of strains carried *inv* gene, 45% of strains carried *yadA* gene and only 10% of strains carried *ystB* gene. The studied result also indicated that not all the pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains must carry all the virulent genes and in the non-pathogenic bacteria strains also present some virulent factors.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, PCR, *ail*, *inv*, *ystA*, *ystB*, *yadA*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Yersinia enterocolitica (*Y. enterocolitica*) là vi khuẩn gây bệnh đường tiêu hóa phổ biến ở các nước phát triển, chỉ sau vi khuẩn *Salmonella* spp. và *Campylobacter* spp. (EFSA, 2007). Lợn được đánh giá là nguồn tàng trữ chính của các chủng *Y. enterocolitica* gây bệnh ở người, mặc dù lợn không có các dấu hiệu lâm sàng của

bệnh. *Y. enterocolitica* có trong khoang miệng, trên lưỡi, hạch amidan, các hạch bạch huyết, trong ruột lợn và lợn thường xuyên bài tiết vi khuẩn này qua phân. Quá trình di chuyển của vi khuẩn *Y. enterocolitica* từ lợn sang người chủ yếu thông qua quá trình tiêu thụ thực phẩm, đặc biệt là thực phẩm không được chế biến và bảo quản đảm bảo vệ sinh.

Hiện nay, *Y. enterocolitica* được xác định có 6 biotype (1A, 1B, 2, 3, 4 và 5) với hơn 70 serotype. Các biotype được phân chia theo đặc tính gây bệnh của chúng. Cụ thể, biotype 1A được xem là biotype không có khả năng gây bệnh, biotype từ 2 đến 5 là các biotype gây bệnh yếu và biotype 1B là biotype gây bệnh nặng. Trong hơn 70 serotype, chỉ có 11 serotype có liên quan đến bệnh ở người và phần lớn có thể được truy nguyên chỉ có 3 serotype phổ biến là O:3, O:8 và O:9 (Bancerz-Kisiel và cs., 2018).

Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng các yếu tố độc lực của *Y. enterocolitica* liên quan đến một số cấu trúc nằm cả trên plasmid và trên nhiễm sắc thể. Các protein được mã hóa bởi các gen này tạo điều kiện cho vi khuẩn xâm nhập vào vật chủ, lẩn tránh các phản ứng miễn dịch và có thể phát triển trong các điều kiện không thuận lợi. Do đó, các gen này thường là mục tiêu được nhắm đến của các xét nghiệm PCR và các phương pháp phân tử khác. Cụ thể các gen nhiễm sắc thể như gen *ail* (kèm theo locus xâm lấn, làm trung gian xâm lấn tế bào), gen *inv* (gen xâm lấn, trung gian xâm lấn tế bào), gen *ystA* (mã hóa một loại nội độc tố bền nhiệt), gen *ystB* và *ystC* (mã hóa một số loại nội độc tố chủ yếu của *Y. enterocolitica*) và các gen plasmid như *yadA* (mã hóa các protein liên quan đến quá trình tự ngưng kết, kháng huyết thanh và tự bám dính), gen *virF* hoặc *icrF*...

Việc xác định các gen độc lực và các đặc tính sinh học của các chủng *Y. enterocolitica* phân lập được là rất cần thiết để xác định được khả năng gây bệnh cũng như điều tra các nguồn, phương thức lây truyền và phân bố địa lý của chúng. Thông tin này đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp các biện pháp kiểm soát quá trình giết mổ và có thể làm giảm nguy cơ truyền các vi khuẩn gây bệnh này sang thịt lợn.

Trong giai đoạn từ năm 2017 đến năm 2020, chúng tôi đã phân lập được nhiều chủng *Y. enterocolitica* từ các mẫu thịt và mẫu phủ tạng của lợn bán tại các chợ bán lẻ cũng như tại lò mổ trên địa bàn thành phố Hà Nội. Những kết quả này bước đầu xác định sự có mặt của

Y. enterocolitica trong chuỗi giá trị thịt lợn tại Hà Nội nói riêng và Việt Nam nói chung. Tuy nhiên, những kết quả trên mới dừng lại ở việc xác định các đặc tính sinh hóa, định danh biotype, serotype và khẳng định loài bằng gen 16S rRNA. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đi sâu hơn vào việc xác định sự hiện diện của các gen độc lực trong hệ gen của các chủng *Y. enterocolitica* phân lập được tại lò mổ ở Hà Nội bằng phương pháp PCR. Mục tiêu cụ thể bao gồm gen nội độc tố *ystA*, *ystB*; gen xâm lấn *inv*; gen bám dính *ail* và gen độc lực plasmid *yadA*.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

Xác định gen độc lực của 20 chủng vi khuẩn *Y. enterocolitica* đã phân lập được, bao gồm gen nội độc tố *ystA*, *ystB*; gen xâm lấn *inv*; gen bám dính *ail* và gen độc lực plasmid *yadA*.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

2.2.1. Mẫu nghiên cứu

Tổng cộng có 20 chủng *Y. enterocolitica* sử dụng trong nghiên cứu này. Đây là các chủng được chúng tôi phân lập từ các mẫu lợn thu thập tại lò mổ trên địa bàn thành phố Hà Nội năm 2019. Sau khi được kiểm tra các đặc tính sinh hóa đặc trưng, xác định biotype và serotype theo TCVN 8127:2009, khẳng định lại loài bằng gen 16S rRNA, các chủng được bảo quản ở -30°C trong môi trường BHI bổ sung 25% glycerol. Trước khi sử dụng, các chủng được nuôi cấy qua đêm trên thạch dinh dưỡng ở 30°C.

2.2.2. Môi trường hóa chất

Thạch dinh dưỡng (Merck, Mỹ); bộ kit Genomic DNA Purification (Thermo Fisher, Mỹ), ethanol absolute (Merck, Mỹ), phusion U multiplex PCR Master mix (Thermo Fisher, Mỹ), DNA gel loading dye (Thermo Fisher, Mỹ), TopVision agarose (Thermo Fisher, Mỹ), GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher, Mỹ), Redsafe (Intron, Hàn Quốc), TBE buffer 10X (bio World, Mỹ), UltraPure™ DNase/

RNase-Free distilled water (Thermo Fisher, Mỹ), các cặp mồi (Sigma-Aldrich, Singapore).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp tách chiết DNA: Sử dụng bộ kit Genomic DNA purification (Thermo Fisher,

Mỹ), thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Phương pháp PCR:

+ Trình tự nucleotide các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Trình tự nucleotide các cặp mồi

TT	Gen	Trình tự (5'-3')	Sản phẩm (bp)	Nhiệt độ bắt mồi (°C)	Tài liệu tham khảo
1	<i>ail</i>	ACTCGATGATAACTGGGGAG CCCCCAGTAATCCATAAAGG	170	55	Nakajima và cs. (1992)
2	<i>ystA</i>	AATGCTGTCTTCATTTGGAGCA ATCCCAATCACTACTGACTTC	145	55	Ibrahim và cs. (1997)
3	<i>ystB</i>	TGTCAGCATTATTCTCAACT GCCGATAATGTATCATCAAG	180	46	Platt - Samoraj và cs. (2006)
4	<i>inv</i>	CTGTGGGGAGAGTGGGGAAGTTTGG GAACTGCTTGAATCCCTGAAAACCG	570	60	Rasmussen và cs. (1994)
5	<i>yadA</i>	CTTCAGATACTGGTGTCTGCTGT ATGCCTGACTAGAGCGATATCC	849	60	Thoerner và cs. (2003)

+ Thành phần phản ứng PCR

Các phản ứng PCR được thiết lập dựa theo nghiên cứu của Nakajima và cs. (1992), Rasmussen và cs. (1994), Thoerner và cs. (2003), Ibrahim và cs. (1997), Platt-Samoraj và cs. (2006); và được chuẩn hóa cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm tại Phòng Thí nghiệm tổng hợp và Bảo tồn quỹ gen, Viện Thú y.

Đối với các cặp mồi xác định gen *ail*, *ystA* và *ystB*: sử dụng phản ứng PCR đơn mồi (singleplex PCR). Tổng lượng phản ứng là 50µl/phản ứng, bao gồm: 25µl Master mix, 1µl mồi xuôi, 1µl mồi ngược, 1µl DNA mẫu và lượng nước vừa đủ.

Đối với cặp mồi *inv* và *yadA*: sử dụng phản ứng PCR đa mồi (multiplex PCR). Tổng lượng phản ứng là 50µl/phản ứng, bao gồm: 25µl Master mix, 1µl mồi xuôi *inv*, 1µl mồi ngược *inv*, 1µl mồi xuôi *yadA*, 1µl mồi ngược *yadA*, 2µl DNA mẫu và lượng nước vừa đủ.

+ Chu trình nhiệt

Chu trình nhiệt cho phản ứng multiplex PCR phát hiện gen *inv* và *yadA*: 15 phút ở 95°C; 35 chu kỳ lặp lại gồm 30 giây ở nhiệt độ 94°C, 90 giây ở 60°C và 90 giây ở 72°C; cuối cùng là 30 giây ở 72°C; giữ ở 4°C.

Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR phát hiện gen *ail* là 60 giây ở 94°C; 25 chu kỳ lặp lại gồm 30 giây ở nhiệt độ 94°C, 60 giây ở 55°C và 2 phút ở 70°C; cuối cùng là 5 phút ở 70°C; giữ ở 4°C.

Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR phát hiện gen *ystA* là 2 phút ở 94°C; 30 chu kỳ lặp lại gồm 30 giây ở nhiệt độ 94°C, 60 giây ở 55°C và 30 giây ở 72°C; cuối cùng là 5 phút ở 72°C; giữ ở 4°C.

Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR phát hiện gen *ystB* là 5 phút ở 95°C; 30 chu kỳ lặp lại gồm 30 giây ở nhiệt độ 94°C, 30 giây ở 46°C và 60 giây ở 72°C; cuối cùng là 10 phút ở 72°C; giữ ở 4°C.

- Kỹ thuật điện di gel agarose và kiểm tra sản phẩm PCR: Sử dụng agarose 1,5%, nhuộm với 2,5 μ l Redsafe (Intron, Hàn Quốc), dung dịch đệm TBE 1X. Chạy điện di bằng dòng điện một chiều với điện thế 100V, cường độ dòng điện 100 mA trong khoảng 30-40 phút. Quan sát kết quả trên máy Imagequant las 500 (GE Healthcare Life Sciences, Mỹ).

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel.

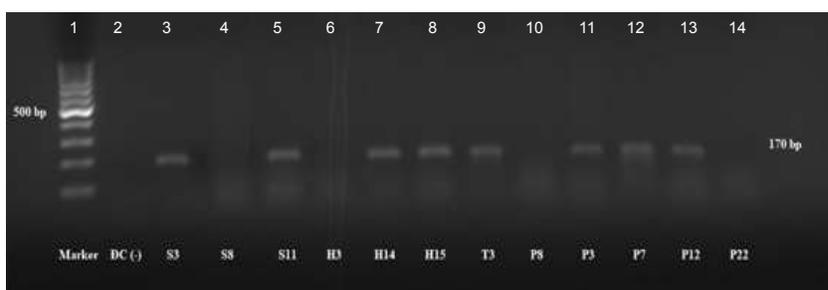
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định gen bám dính *ail*

Gen *ail* là gen mã hóa ail - một protein màng ngoài giúp thúc đẩy sự gắn kết và xâm lấn, luôn được tìm thấy trong các chủng *Y. enterocolitica* có khả năng gây bệnh. Đây cũng là một trong những gen thường được sử dụng làm gen đích để phát hiện các chủng có khả năng gây bệnh và phân biệt nhanh với các chủng không có khả năng gây bệnh (Thoerner và cs., 2003).

Bảng 2. Kết quả xác định gen bám dính *ail*

Bioserotype	Số chủng	Dương tính	Tỷ lệ (%)
1A/O:5	9	5	55,56
1B/O:8	5	5	100
4/O:3	6	6	100
Tổng số	20	16	80



Hình 1. Hình ảnh điện di kiểm tra sự có mặt của gen bám dính *ail* trên gel agarose 1,5%
Lane 1: Marker 100bp, lane 2: Đối chứng âm, lane 3 – 14: DNA các chủng *Y. enterocolitica* phân lập được

Kết quả ở bảng 2 cho thấy 100% các chủng thuộc bioserotype 4/O:3 và bioserotype 1B/O:8 đều mang gen bám dính *ail*. Điều này cũng phù hợp với những tài liệu trên thế giới vì đây là 2 bioserotype đều có khả năng gây bệnh.

Những nghiên cứu từ trước năm 2000 đều báo cáo rằng có sự vắng mặt của gen *ail* trong các chủng không có khả năng gây bệnh thuộc biotype 1A. Tuy nhiên, một số nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng trong một số chủng thuộc

biotype 1A cũng có thể phát hiện được sự có mặt của gen *ail* (Falcao và cs., 2006).

Theo Cheyne và cs. (2010), trong 5 chủng thuộc bioserotype 1A/O:5 kiểm tra có tới 3/5 chủng (60%) phát hiện thấy gen *ail*. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, khi có tới 5/9 chủng thuộc bioserotype 1A/O:5 (55,56%) được xác định là dương tính bằng phương pháp PCR. Qua đó có thể khẳng định, các phương pháp chỉ dựa trên

gen *ail* là không đủ để phát hiện các chủng *Y. enterocolitica* có khả năng gây bệnh thực sự.

3.2. Kết quả xác định gen nội độc tố *ystA*

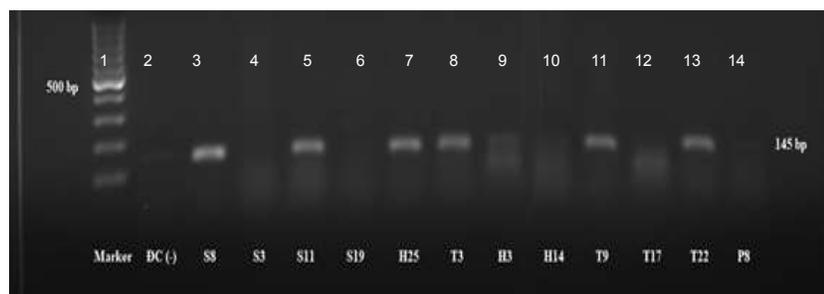
Các chủng *Y. enterocolitica* gây bệnh nguyên phát được biết đến có khả năng sản sinh một loại

nội độc tố chịu nhiệt là *ystI*A. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng *ystA* – gen mã hóa *ystI*A là một trong những yếu tố độc lực chính của các chủng *Y. enterocolitica* gây bệnh (Delor và cs., 1990).

Kết quả xác định gen *ystA* được trình bày trên bảng 3 và hình 2.

Bảng 3. Kết quả xác định gen nội độc tố *ystA*

Bioserotype	Số chủng	Dương tính	Tỷ lệ (%)
1A/O:5	9	4	44,44
1B/O:8	5	2	40
4/O:3	6	6	100
Tổng số	20	12	60



Hình 2. Hình ảnh điện di kiểm tra sự có mặt của gen nội độc tố *ystA* trên gel agarose 1,5%
Lane 1: Marker 100bp, lane 2: Đối chứng âm, lane 3 – 14: DNA các chủng *Y. enterocolitica* phân lập được

Trong 20 chủng sử dụng trong nghiên cứu này, có 12 chủng được xác định mang gen *ystA*, chiếm tỷ lệ 60%. Trong đó 100% các chủng thuộc bioserotype 4/O:3 đều mang gen *ystA* (6/6 chủng), tiếp theo là các chủng thuộc bioserotype 1A/O:5 (44,4%) và cuối cùng là các chủng thuộc bioserotype 1B/O:8 (40%).

Theo Sacchini và cs. (2018), 100% chủng thuộc bioserotype 4/O:3 phân lập từ lợn (56/56 chủng) đều mang gen *ystA*, tương tự với kết quả nghiên cứu của Stephan và cs. (2013) tại Đại học Zurich.

Một số nghiên cứu trước đây đã chỉ ra gen *ystA* là gen thường được phát hiện ở biotype 1B.

Nghiên cứu của Saberianpour và cs. (2014) cho biết tỷ lệ phát hiện các gen *ystA* trong biotype 1B là 94,11%. Tỷ lệ này lên tới 100% trong các nghiên cứu của Zheng và cs. (2008). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, tỷ lệ các chủng thuộc biotype 1B được phát hiện mang gen *ystA* chỉ có 40%, thấp hơn nhiều so với những kết quả trên. Nguyên nhân có thể do sự sai khác về nguồn gốc phân lập, nơi phân lập và serotype của các chủng kiểm tra. Cụ thể, trong nghiên cứu của chúng tôi, chỉ có sự xuất hiện của bioserotype 1B/O:8.

Gen *ystA* là gen được tìm thấy trong các biotype có khả năng gây bệnh. Tuy vậy trong các báo cáo gần đây, gen *ystA* cũng đã được

phát hiện có trong biotype 1A với tỷ lệ dao động từ 8,69% đến 75% (Saberianpour và cs., 2014; Zheng và cs., 2008). Qua đó, có thể thấy có sự phù hợp giữa kết quả của nghiên cứu này với các nghiên cứu khác trên thế giới, mặc dù tồn tại sự khác biệt về các tỷ lệ.

3.3. Kết quả xác định gen nội độc tố *ystB*

Độc lực của chủng *Y. enterocolitica* thuộc các biotype gây bệnh nguyên phát, cụ thể là thuộc các biotype 1B và các biotype từ 2 đến 5, được xác định là do sự hiện diện của các độc tố plasmid, các gen nhiễm sắc thể liên quan đến quá trình xâm lấn như gen *inv*, gen *ail* và gen nội độc tố *ystA*. (Delor và Cornelis, 1992; Pierson và Falkow, 1990). Trong khi đó, hầu hết các chủng trong biotype 1A được xác định là thiếu các dấu hiệu độc lực trên (Delor và Cornelis,

1992; Pierson và Falkow, 1990), vì vậy các chủng thuộc biotype này được coi là không có khả năng gây bệnh. Tuy nhiên, biotype 1A cũng đã được xác định có liên quan đến nhiều ổ dịch tiêu chảy (Butt và cs., 1991). Viêm ruột-dạ dày gây ra bởi các chủng thuộc biotype 1A cũng không thể phân biệt được với bệnh gây ra bởi các biotype gây bệnh nguyên phát (Burnens và cs., 1996). Các nghiên cứu cũng đã chỉ ra rằng *ystB* - gen mã hóa và sản xuất enterotoxin chịu nhiệt *ystIB* là tác nhân chính gây bệnh tiêu chảy do các chủng *Y. enterocolitica* thuộc biotype 1A gây ra (Singh và Viridi, 2004).

Chúng tôi cũng đã tiến hành xác định sự có mặt của gen *ystB* trong 20 chủng *Y. enterocolitica* sử dụng trong nghiên cứu này. Kết quả được trình bày trên bảng 4 và hình 3.

Bảng 4. Kết quả xác định gen nội độc tố enterotoxin *ystB*

Bioserotype	Số chủng	Dương tính	Tỷ lệ (%)
1A/O:5	9	2	22,22
1B/O:8	5	0	0
4/O:3	6	0	0
Tổng số	20	2	10



Hình 3. Hình ảnh điện di kiểm tra sự có mặt của gen nội độc tố *ystB* trên gel agarose 1,5%
Lane 1: Marker 100bp, lane 2: Đối chứng âm, lane 3 – 14: DNA các chủng *Y. enterocolitica* phân lập được

Qua bảng 4, chúng tôi nhận thấy chỉ có 2/20 chủng *Y. enterocolitica* phân lập được có sự xuất hiện của gen nội độc tố *ystB*, chiếm tỷ lệ 10%.

Cả 2 chủng này đều thuộc bioserotype 1A/O:5. Kết quả này tương tự với một số kết quả nghiên cứu khác đã được công bố trên thế giới. Tennant

và cs. (2003) cho biết 80% các chủng thuộc biotype 1A được báo cáo có mang gen *ystB*.

Trong 45 chủng *Y. enterocolitica* phân lập từ lợn nái, Platt-Samoraj A và cs. (2006) cũng đã xác định được có tới 40/45 chủng thuộc biotype 1A và tất cả các chủng thuộc biotype 1A đều chỉ mang gen *ystB* trong khi các chủng còn lại thuộc biotype 4/O:3 mang cả gen *ail* và gen *ystA*.

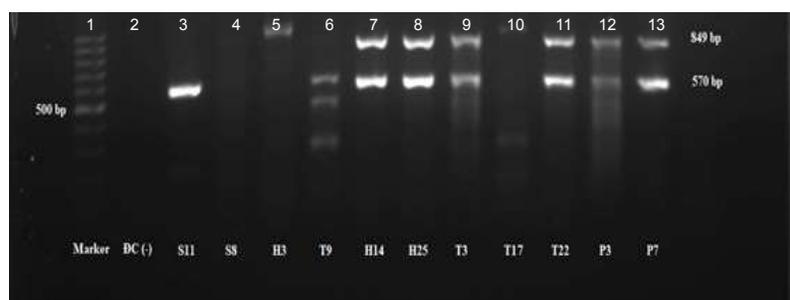
3.4. Kết quả xác định gen xâm lấn *inv*

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng: Sản phẩm

của gen *inv* - invasin đóng vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy sự xâm nhập của *Y. enterocolitica* trong giai đoạn đầu của quá trình nhiễm khuẩn, chủ yếu liên quan đến sự phát triển của vi khuẩn trong các tế bào biểu mô của vật chủ. Đây là một trong những yếu tố độc lực không thể thiếu đối với các chủng *Y. enterocolitica* có khả năng gây bệnh. *Inv* có thể được tìm thấy trong tất cả các loài *Yersinia*. 20 chủng vi khuẩn đã được xác định gen *inv* bằng phản ứng PCR với sản phẩm dự kiến là 570 bp. Kết quả được trình bày trên bảng 5 và hình 4.

Bảng 5. Kết quả xác định gen xâm lấn *inv*

Bioserotype	Số chủng	Dương tính	Tỷ lệ (%)
1A/O:5	9	1	11,11
1B/O:8	5	3	60
4/O:3	6	6	100
Tổng số	20	10	50



Hình 4. Hình ảnh điện di kiểm tra sự có mặt của gen xâm lấn *inv* và gen độc lực plasmid *yadA* trên gel agarose 1,5%

Lane 1: Marker 100bp, lane 2: Đối chứng âm, lane 3 – 11: DNA các chủng *Y. enterocolitica* phân lập được

Từ kết quả trên có thể thấy, 100% các chủng thuộc bioserotype 4/O:3 đều mang gen *inv*, trong khi đó tỷ lệ này ở các chủng thuộc bioserotype 1B/O:8 là 60% và ở các chủng thuộc bioserotype 1A/O:5 chỉ là 11,11%.

Năm 2019, Tavassoli và cs. đã chỉ ra trong 13 chủng thuộc biotype 1B được kiểm tra, chỉ

có 6/13 chủng (46,15%) phát hiện có mang gen *inv*. Đối với các chủng thuộc biotype 1A; tỷ lệ này là 60,83%. Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng tỷ lệ này ở các chủng thuộc biotype 4 lên tới 100% (Sacchini và cs., 2018; Zheng và cs., 2008).

Có thể thấy, kết quả của chúng tôi có nhiều

điểm tương đồng với các nghiên cứu đã công bố trên thế giới. Mặc dù tỷ lệ phát hiện gen *inv* trên các chủng thuộc biotype 1A còn thấp nhưng cũng đã có thể khẳng định sự tồn tại của gen này trong các chủng được coi là không gây bệnh tại Hà Nội nói riêng và Việt Nam nói chung.

Bảng 6. Kết quả xác định gen độc lực plasmid *yadA*

Bioserotype	Số chủng	Dương tính	Tỷ lệ (%)
1A/O:5	9	1	11,11
1B/O:8	5	3	60
4/O:3	6	5	83,33
Tổng số	20	9	45

Một số nghiên cứu trên thế giới đã báo cáo rằng, gen *yadA* là một gen plasmid và không có trong kiểu gen của biotype 1A (Bancerz-Kisiel và cs., 2018; Tavassoli và cs., 2019). Tuy nhiên, Thoerner và cs. (2003) đã phát hiện ra 1 trường hợp biotype 1A mang gen *yadA*. Kết quả này cũng tương ứng với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, khi trong 9 chủng thuộc biotype 1A kiểm tra phát hiện 1 chủng mang gen *yadA*. Nguyên nhân của sự sai khác này có thể do các chủng đã được phân lập từ những đối tượng khác nhau và ở các khu vực địa lý khác biệt.

Với các chủng thuộc biotype 1B và biotype 4, tỷ lệ phát hiện gen *yadA* tương ứng là 60% và 83,33%. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây mặc dù tỷ lệ thấp hơn (Zheng và cs., 2008; Sacchini và cs., 2018).

IV. KẾT LUẬN

Bằng phản ứng PCR, chúng tôi đã xác định được rằng 80% các chủng trong nghiên cứu mang gen *ail*, 60% mang gen *ystA*, 50% mang gen *inv*, 45% mang gen *yadA* và chỉ có 10% mang gen *ystB*.

Có thể thấy không phải 100% các gen độc lực đều có ở các chủng có khả năng gây bệnh bao gồm cả chủng gây bệnh yếu (biotype 2, 3, 4 và 5) và chủng gây bệnh nặng (biotype 1B). Bên cạnh đó, các chủng không có khả năng gây bệnh

3.5. Kết quả xác định gen độc lực plasmid *yadA*

Gen *yadA* cùng với gen *ail* và *inv* là 3 gen mã hóa các protein chủ yếu tham gia vào quá trình kết dính và xâm lấn của *Y. enterocolitica*.

Kết quả xác định gen *yadA* được trình bày trên bảng 6 và hình 4.

thuộc bioserotype 1A/O:5 cũng được phát hiện có mang các gen độc lực kể trên.

Kết quả này cũng đặt ra nhiều câu hỏi về cơ chế gây bệnh của các chủng *Y. enterocolitica*, sự tương tác của các gen độc lực trong hệ gen của vi khuẩn và liệu các chủng thuộc biotype 1A có thực sự là các chủng không có khả năng gây bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bancerz-Kisiel, A., Pieczywek, M., Łada, P., Szweida, W., 2018. The most important virulence markers of *Yersinia enterocolitica* and their role during infection. *Genes* 9, 235.
2. Burnens, A., Frey, A., Nicolet, J., 1996. Association between clinical presentation, biogroups and virulence attributes of *Yersinia enterocolitica* strains in human diarrhoeal disease. *Epidemiology & Infection*, 116, 27-34.
3. Butt, H.L., Gordon, D.L., Lee-Archer, T., Moritz, A., Merrell, W.H., 1991. Relationship between clinical and milk isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Pathology*, 23, 153-157.
4. Cheyne, B.M., Van Dyke, M.I., Anderson, W.B., Huck, P.M., 2010. The detection of *Yersinia enterocolitica* in surface water by quantitative PCR amplification of the *ail* and *yadA* genes. *Journal of Water and health* 8, 487-499.
5. Delor, I., Cornelis, G.R., 1992. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection

- of young rabbits. *Infection and immunity*, 60, 4269-4277.
6. Delor, I., Kaeckenbeeck, A., Wauters, G., Cornelis, G., 1990. Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae. *Infection and immunity*, 58, 2983-2988.
 7. EFSA, 2007. *Yersinia*. *EFSA Journal* 130, 190-195.
 8. Falcao, J.P., Falcao, D.P., Pitondo-Silva, A., Malaspina, A.C., Brocchi, M., 2006. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 1539-1548.
 9. Ibrahim, A., Liesack, W., Griffiths, M.W., Robins-Browne, R.M., 1997. Development of a highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR amplification of the *Yersinia* heat-stable enterotoxin gene (*yst*). *Journal of clinical microbiology*, 35, 1636-1638.
 10. Nakajima, H., Inoue, M., Mori, T., Itoh, K., Arakawa, E., Watanabe, H., 1992. Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 2484-2486.
 11. Pierson, D.E., Falkow, S., 1990. Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional *inv*-homologous sequences. *Infection and immunity*, 58, 1059-1064.
 12. Platt - Samoraj, A., Ugorski, M., Szweda, W., Szczerba - Turek, A., Wojciech, K., Procajło, Z., 2006. Analysis of the presence of *ail*, *ystA* and *ystB* genes in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from aborting sows and aborted fetuses. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 53, 341-346.
 13. Rasmussen, H.N., Rasmussen, O.F., Andersen, J.K., Olsen, J.E., 1994. Specific detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by two-step PCR using hot-start and DMSO. *Molecular and cellular probes* 8, 99-108.
 14. Saberianpour, S., Tajbakhsh, E., Khamesipour, F., Branch, S., 2014. Prevalence of virulence genes and biotyping of *Yersinia enterocolitica* isolated from chicken meat in Shahrekord, Iran. *Vidyabharati International Interdisciplinary Research Journal* 3, 71-76.
 15. Sacchini, L., Garofolo, G., Di Serafino, G., Marotta, F., Ricci, L., Di Donato, G., Miracco, M.G., Perletta, F., Di Giannatale, E., 2018. The prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* in pigs from Central Italy. *Veterinaria Italiana* 54, 115-123.
 16. Singh, I., Viridi, J.S., 2004. Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Medical Microbiology* 53, 1065-1068.
 17. Stephan, R., Joutsen, S., Hofer, E., Säde, E., Björkroth, J., Ziegler, D., Fredriksson-Ahomaa, M., 2013. Characteristics of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from patients and asymptomatic carriers. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 32, 869-875.
 18. Tavassoli, M., Jamshidi, A., Movafagh, F., Afshari, A., 2019. Virulence characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolated from dairy products in the northeast of Iran. *Journal of Human, Environment and Health promotion* 5, 72-78.
 19. Tennant, S.M., Grant, T.H., Robins-Browne, R.M., 2003. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 38, 127-137.
 20. Thoerner, P., Kingombe, C.B., Bögli-Stuber, K., Bissig-Choisat, B., Wassenaar, T., Frey, J., Jemmi, T., 2003. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1810-1816.
 21. Zheng, H., Sun, Y., Mao, Z., Jiang, B., 2008. Investigation of virulence genes in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 53, 368-374.

Ngày nhận 4-2-2020

Ngày phản biện 15-3-2020

Ngày đăng 1-9-2020