XÁC ĐỊNH MỘT SỐ GENE ĐỘC LỰC TRÊN CÁC SEROTYPE *SALMONELLA* GÂY BỆNH CHO NGƯỜI ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ THỊT TƯƠI TẠI TỈNH BÌNH THUẬN

Lê Thế Biên[1,2*] và Trương Xuân Sỹ[2,3]
[1]*Trường Đại học Phan Thiết*
[2]*Công ty TNHH Tập đoàn Nam Dược BS*
[3]*Bệnh viện Quận Thủ Đức*
(*Email: lethebien851720@gmail.com)

Ngày nhận: *17/12/2020*
Ngày phản biện: *11/01/2021*
Ngày duyệt đăng: *22/02/2021*

TÓMTẮT

Nghiên cứu được thực hiện để đánh giá sự hiện diện một số gene độc lực của các gốc Salmonella được phân lập từ các mẫu thịt tươi lấy tại các chợ và cơ sở giết mổ (CSGM) ở tỉnh Bình Thuận. Tổng số 15/107 gốc Salmonella phân lập thuộc 6 serotype (S. Typhimurium, S. Weltevreden, S. Anatum, S. Braenderup, S. Newport, S. Schwavzengrund) được xác định sự hiện diện các gene độc lực invA, stn, spvC và sefC bằng kỹ thuật polymerase chain reaction (PCR). Kết quả cho thấy 100% (107 gốc phân lập) Salmonella mang gene invA, 93,46% gốc mang gene stn, 32,71 % gốc mang gene spvC và 5,6% gốc mang gene sefC. Trong đó, gene invA và stn hiện diện trên tất cả 6 serotype S. Typhimurium,S. Weltevreden, S. Anatum, S. Braenderup, S. Newport, S. Schwavzengrund, gene spvC chỉ hiện diện trên S. Typhimurium và không có serotype nào mang gene sefC.

Từ khóa: *Thịt tươi, Salmonella, serotype, gene độc lực*

Trích dẫn: Lê Thế Biên và Trương Xuân Sỹ, 2021. Xác định một số gene độc lực trên các serotype *salmonella* gây bệnh cho người được phân lập từ thịt tươi tại tỉnh Bình Thuận. Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế Trường Đại học Tây Đô. 11: 252-259.

**Ths. Lê Thế Biên – Phòng Quản lý và Phát triển dự án, Trường Đại học Phan Thiết*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Salmonella là vi khuẩn đường ruột gây bệnh phổ biến cho người và động vật. Hiện nay, các nhà khoa học đã xác định được khoảng 2500 serotype *Salmonella* (Grimont, 2007). Các serotype của *Salmonella* có thể lây nhiễm từ người sang động vật và ngược lại. (Trần Thị Xuân Mai, 2011; Phạm Thị Ngọc, 2013; Trần Thị Quỳnh Lan và ctv., 2013)

Nhiều nghiên cứu cho thấy sự lây nhiễm *Salmonella* trên người do sử dụng thịt có nguồn gốc không đảm bảo an toàn thực phẩm. *Salmonella* hoặc (1) có mặt trong đường ruột của động vật (heo, bò, gà) và nhiễm lên quầy thịt tại thời điểm giết mổ hoặc (2) có trong môi trường sẽ nhiễm lên quầy thịt trong quá trình giết mổ, vận chuyển và bày bán. Các serotype *Salmonella* được phát hiện trên heo bao gồm *S.* Typhimurium, *S.* Anatum, *S.* Senftenberg và trên gà là *S.* Enteritidis (Trần Thị Quỳnh Lan và ctv., 2013). Trong khi đó các serotype phổ biến nhiễm trên thịt là *S.* Derby, *S.* Typhimuryum, *S.* Rissen… với tỉ lệ mẫu thịt nhiễm *Salmonella* tại CSGM lên đến 60 % (Phạm Thị Ngọc và ctv., 2013).

Mục đích của nghiên cứu này là xác định sự hiện diện một số gene độc lực trên các serotype *Salmonella* gây bệnh cho người phân lập từ mẫu thịt tươi.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung

Nghiên cứu thực hiện trên các gốc *Salmonella* phân lập từ thịt tươi (heo, bò, gà) để thực hiện 2 nội dung chính: (1) Xác định các serotype *Samonella* từ các gốc phân lập và (2) Xác định sự hiện diện 4 gene độc lực bao gồm *invA*, *stn*, *spvC* và *sefC*.

2.2. Vật liệu

107 mẫu *Salmonella* sử dụng trong nghiên cứu được phân lập từ mẫu thịt tươi lấy từ một số CSGM và chợ tại tỉnh Bình Thuận.

Môi trường, kháng huyết thanh (KHT) và hoá chất sử dụng nuôi cấy và phân lập *Salmonella* bao gồm: Buffer Peptone Water, Rappaport and Vassiliadis Soya, Tetrathionate Enrichement Broth, Brilliant Green Agar Base, Nutrient Agar, Triple Sugar Iron Agar, Lysine Decarboxylase Broth, Tryptone Water (Merck), Xylose Lysine Desoxycholate (Oxoid). Đĩa giấy thử sinh hóa Urease, VP, ONPG, thuốc thử Kovac's, anpha napthone, KOH 40% (Nam Khoa). KHT đa giá O và H (Viện Pasteur, TP.HCM). KHT đơn giá O và H của hãng Denka Seiken (Nhật Bản).

Kit ly trích DNA *Salmonella* (Qiagen).*S.*TyphimuriumATCC 14028 dùng làm đối chứng dương và *E. coli* ATCC 25922 làm đối chứng âm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Thu thập mẫu thịt tươi được thực hiện theo quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01 - 04 :2009/BNNPTNT.

Salmonella spp. được xác định qua nuôi cấy, phân lập và thử phản ứng sinh

hóa, KHT đa giá O và H theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 4829:2005.

Định serotype *Salmonella* với các KHT đơn giá đặc hiệu nhóm O và H (Quy trình Viện Pasteur TP.HCM).

Xác định gene độc lực *Salmonella* bằng phương pháp PCR. Trình tự các các cặp mồi và chu trình nhiệt cho các phản ứng được tham khảo từ các nghiên cứu đã được công bố trước đây. (Murugkar và cs. 2003; Amini, 2010; Trần Thị Xuân Mai và cs., 2011). Các cặp mồi xác định gen độc lực bao gồm (*invA*-F)5' TGG CAT TAT CGA TCA GTA CCA G 3' (*invA*-R)5' AAC AGC TGC GTC ATG ATA TTC C 3' kích thước 600bp; (*stn*-F) *5'* GCC GTA CAC GAG CTT ATA GA 3'(*stn*-R) 5'ACC TAC AGG GGC ACA ATA AC 3' kích thước 617 bp; (*spvC*-F) 5' GCC GTA CAC GAG CTT ATA GA 3' (*spvC*-R) 5' ACC TAC AGG GGC ACA ATA AC 3' kích thước 250bp; (*sefC*-F) 5' GCG AAA ACC AAT GCG ACT GTA 3' (*sefC*-R) 5' CCC ACC AGA AAC ATT CAT CCC 3' kích thước 1103 bp.

Thành phần các phản ứng PCR bao gồm 12,5 µl DreamTaq^{TM} Green PCR Master Mix 2X, 1µl mồi (25pM), 2 µl mẫu DNA ly trích và thêm nước tinh sạch cho vừa đủ 25µl.

Sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose 1,5% trong dung dịch đệm TBE 1X và đọc kết quả bằng máy BioRad - ChemiDoc XRS. Thang chuẩn GeneRuler^{TM} 100bp Plus DNA Ladder (FERMENTAS SM0321- ĐỨC) để ước lượng kích thước đoạn sản phẩm PCR.

3.1. Sự hiện diện các serotype *Salmonella* từ các gốc *Salmonella* phân lập từ thịt

Kết quả xác định serotype (Bảng 1) cho thấy trên thịt tươi nhiễm các các serotype gồm *S.* Typhimurium, *S.* Weltevreden, *S.* Anatum, *S.* Braenderup, *S.* Newport, *S.* Schwavzengrund. Tuy nhiên có 85,9% *Salmonella* phân lập chưa xác định được serotype do nguồn KHT đặc hiệu chưa đầy đủ. Tại Việt Nam, heo nhiễm các serotype *S.* Senftenberg *Salmonella* Typhimurium, *S.* Anatum, *Salmonella* Paratyphi B và gà nhiễm *S.* Enteritidis (Trần Thị Quỳnh Lan và ctv., 2013). Tại Thái Lan, hai serotype nhiễm phổ biến trên heo là *S.* Rissen và *S.* Typhimurium (Phengjai Sangvatanakul, 2007). Trong khi đó *Salmonella* nhiễm trên thịt gà gồm *S.* Agona, *S.* London, *S.* Emek và *S.* Typhimurium (Lưu Quỳnh Hương và ctv., 2006).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Bảng 1. Sự hiện diện các serotype *Salmonella*

Serotype n (%)	Heo	Thịt Bò	Gà	Tổng
S. Typhimurium	4 (3,73)	2 (1,86)	1 (0,93)	7 (6,54)
S. Weltevreden	1 (0,93)	2 (1,86)		3 (2,8)
S. Anatum	1 (0,93)	1 (0,93)		2 (1,86)
S. Braenderup			1 (0,93)	1 (0,93)
S. Newport		1 (0,93)		1 (0,93)
S. Schwavzengrund		1 (0,93)		1 (0,93)
Chưa xác định				92 (85,9)
Tổng	6	7	2	107

3.2. Sự hiện diện các gene độc lực

Xác định các gene độc lực (Bảng 2) cho thấy gene *invA* hiện diện trên tất cả serotype *Salmonella* phân lập, gene *stn* được phát hiện với tỷ lệ khá cao (93,46 %). Gene *invA* khởi đầu quá trình vi khuẩn xâm nhiễm vào tế bào vật chủ (Galan và cs., 1992), đây là giai đoạn mở đường cho tiến trình bệnh lý vì vậy *invA* có giá trị trong chẩn đoán các serotype gây bệnh.

Gene *stn* liên hệ với độc tố ruột (enterotoxin) gây tiêu chảy bằng cách liên kết với thụ thể để kích hoạt hệ thống tín hiệu thông tin thứ cấp của cAMP và cGMP, hoạt hóa quá trình tiết quá mức dịch từ tế bào biểu mô gây tiêu chảy. Gene *spvC* thuộc plasmid độc lực có chức năng phân hủy phosphothreonin làm bất hoạt ezyme MAPK ở tế bào chủ (Mazurkiewicz et al., 2008). Do thuộc plasmid độc lực nên gene này có khả năng truyền tính độc trong cùng serotype và giữa các serotype khác nhau.

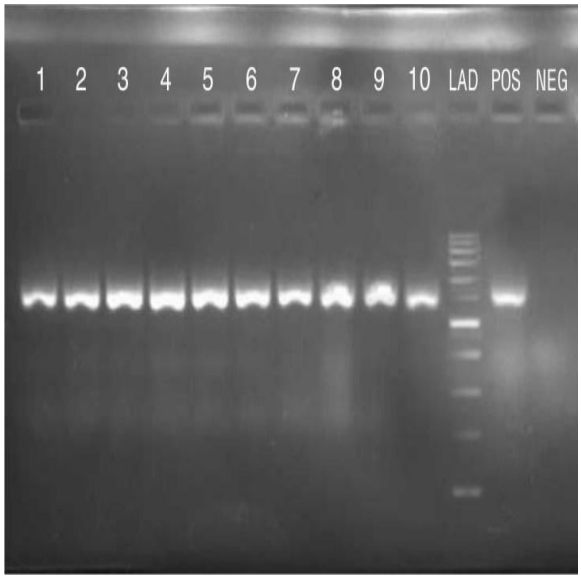
Bảng 2. Sự hiện diện gene độc lực của *Salmonella*

Gene (%)	Thịt heo (n=35)	Thịt bò (n=28)	Thịt gà (n=44)
invA	100	100	100
stn	91,43	96,43	93,18
spvC	34,29	21,43	38,64
sefC	0,00	0,00	13,64

3.3. Gene độc lực của các serotype

Tất cả các serotype *Salmonella* đều có mang gene *invA* (100 %) và 93,3% serotype mang gene *stn* (Bảng 3). *S.* Typhimurium có tần số xuất hiện các gene độc lực (*invA, stn, spvC*) cao nhất, đặc biệt *spvC* chỉ xuất hiện trên *S.*Typhimurium mà không xuất hiện ở các serotype khác. Gene *spvC* là gene chủ yếu của *S.*

Salmonella bám dính bề mặt niêm mạc ruột được xem là bước khởi đầu quan trọng trong sinh bệnh học của vi khuẩn. Vi khuẩn gắn vào tế bào đích thông qua sự tương tác giữa các yếu tố kết bám trên bề mặt vi khuẩn với thụ thể chuyên biệt của vật chủ. Khả năng này liên hệ với gene *sefC*. Tuy nhiên gene này không phát hiện trên 6 serotype nhưng lại phát hiện trên các gốc *Salmonella* phân lập chưa xác định được serotype (Bảng 2). Như vậy cần có những nghiên cứu tiếp theo để xác định serotype nào chuyên biệt cho *sefC*.



Hình 1. Kết quả điện di gene *invA*

1-10: mẫu dương tính với gen *invA;* LAD: Thang chuẩn; POS: đối chứng dương (*S.*Typhymurium ATCC 14028); NEG: đối chứng âm (*E. coli* ATCC 25922)

Bảng 3. Sự hiện diện các gene độc lực trên các serotype *Salmonella*

Serotype	n	Gene quy định yếu tố độc lực (%)			
		invA	*stn*	*spvC*	*sefC*
S. Typhimurium	7	100	100	28,57	0,00
S. Weltevreden	3	100	66,67	0,00	0,00
S. Anatum	2	100	100	0,00	0,00
S. Braenderup	1	100	100	0,00	0,00
S. Newport	1	100	100	0,00	0,00
S. Schwavzengrund	1	100	100	0,00	0,00
Tổng	15	100	93,33	13,33	0,00

4. KẾT LUẬN

Salmonella phân lập từ thịt (heo, bò, gà) có độc tính cao do mang các gene độc lực quan trọng (*invA, stn, spvC, sefC*) quyết định tiến trình bệnh lý. *S.* Typhimurium là serotype phổ biến và đặc trưng về khả năng gây bệnh do có đầy đủ các đặc tính như xâm nhiễm, gây độc tế bào và gây tiêu chảy. Kết quả của nghiên cứu này cùng với những nghiên cứu trước đây về các serotype *Salmonella* nhiễm trên động vật (Trần Thị Quỳnh Lan và ctv., 2013) cho thấy nguy cơ nhiễm các serotype gây bệnh cho người nếu sử dụng các sản phẩm động vật nhiễm khuẩn.

Nghiên cứu về các serotype *Salmonella* và độc tính cần thực hiện thêm trên người để tìm mối liên hệ trong con đường truyền lây. Mặt khác, cần xác định *Salmonella* nhiễm sang thịt bằng con đường nào để có những biện pháp hạn chế nguy cơ ngộ độc thực phẩm ở người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Amini K., Salehi Z. T., Nikbakht G., Ranjbar R., Amini J., and Ashrafganjooei B. S., 2010. Molecular detection of invA and spv virulence genes in Salmonella Enteritidis isolated from human and animals in Iran. African Journal of Microbiology Research (21): 2202-2210.

2. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 2009. Quy chuẩn Việt Nam QCVN 01-04:2009 : Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia kỹ thuật lấy và bảo quản mẫu thịt tươi từ các cơ sơ giết mổ và kinh doanh thịt để kiểm tra vi sinh vật, Hà Nội.

3. Galan J.E., Ginocchio C. and Costeas P., 1992. Molecular and functional characterization of the Salmonella invasion gene invA: homology of InvA to members of a new protein family. J. Bacteriology, 174 (13): 4338-4349.

4. Grimont, Patrick A.D.; Xavier Weill, François, 2007. Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars. Institut Pasteur, Paris, France: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. pp. 7.

5. Piotr Mazukiewicz, Jerry Thomas, Jessica Ann T. and Mei Liu, 2008. SpvC is a Salmonella effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. Moleculer Microbiology, 67 (6): 1371-1383.

6. Murugkar H.V., Rahman H. & Dutta P.K., 2003. Distribution of virulence genes in Salmonellaserovars isolated from man & animals. Indian J Med Res 117: pp 66-70.

7. Lưu Quỳnh Hương, Trần Thị Hạnh, Fries Reinhard, Pawin Padungtod, 2006. Kết quả định typ các serotype Salmonalla phân lập từ thịt gà trên địa bàn Hà Nội. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y (số I), trang 50-53.

8. Phạm Thị Ngọc, Nguyễn Tiến Thành, Trần Thị Hạnh, Nguyễn Việt Hùng, 2013. Tỷ lệ nhiễm Salmonella trên lợn tại một số trang trại và lò mổ thuộc các tỉnh phía Bắc Việt Nam. Tạp chí Y học dự phòng (số 4), trang 59-66.

9. Phengjai Sangvatanakul, 2007. Prevalence of Salmonella in piglets and in the fattening period in Chiang Mai, ThaiLand. Master of Veterinary public health. Chiang Mai University and Freie Universitat Berlin.

10. Trần Thị Quỳnh Lan, Nguyễn Thị Mỹ Nhân và Nguyễn Thị Huyền, 2013. Khảo sát sự hiện diện các nhóm và týp huyết thanh Salmonella phân lập từ phân heo và gà. Tạp chí khoa học kỹ thuật Thú y (số 3), trang 30-36.

11. Trần Thị Xuân Mai, Võ Thị Thanh Phương, Trần Thị Hoàng Yến và Nguyễn Văn Bé, 2011. Phát hiện nhanh Salmonella spp, Salmonella enterica hiện diện trong thực phẩm bằng kỹ thuật PCR đa mồi (Multiplex PCR). Tạp chí Khoa học, trang 198-208.

IDENTIFICATION OF VIRULENCE GENES OF PATHOGENIC *SALMONELLA* SEROTYPES FOR HUMANS ISOLATED FROM FRESH MEAT IN BINH THUAN PROVINCE

Le The Bien[1,2*] and Truong Xuan Sy[2,3]
[1]*University of Phan Thiet*
[2]*Nam Duoc BS Limited Company*
[3]*Thu Duc District Hospital*
(**Email: lethebien851720@gmail.com)*

ABSTRACT

The study was carried out to evaluate the presence of virulence genes of Salmonella isolates from fresh meat samples which were collected from slaughterhouse and markets in Binh Thuan Province. A total of 15/107 isolates belonging to 6 serotypes (S. Typhimurium, S. Weltevreden, S. Anatum, S. Braenderup, S. Newport, S. Schwavzengrund) were characterized by polymerase chain reaction (PCR) for detection of Salmonella invasion gene A (invA) and Salmonella virulence plasmid C (spvC) genes, Salmonella enterotoxin (stn) and Salmonella Enteritidis fimbrial C (sefC) genes. Results indicated that InvA gene appeared in all isolates (107 isolates), stn gene was found on 93.46% of isolates, spvC gene and sefC gene were found on 32.71% and 5.6% isolates. No isolate carried sefC gene. InvA and stn genes were found on all 6 serotypes (S. Typhimurium, S. Weltevreden, S. Anatum, S. Braenderup, S. Newport, S. Schwavzengrund). spvC gene was found only among S. Typhimurium serotype. No serotype carried sefC gene.

Keywords: *Fresh meat, Salmonella, serotype, virulence genes*