

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC PHÂN TỬ VI KHUẨN *SALMONELLA* PHÂN LẬP TỪ MẪU THỰC PHẨM TẠI VIỆT NAM

Lê Hà Thu¹, Đặng Thị Thanh Sơn², Trương Thị Quý Dương², Trương Thị Hương Giang², Trần Thị Nhật², Chu Thị Huyền Trang³, Đào Thu Thảo³, Lê Quang Huân³

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện để xác định đặc điểm sinh học gen đặc trưng (gen *InvA* và *Omp*) của *Salmonella* phân lập được từ thực phẩm (thịt lợn, thịt gà) tại Việt Nam bằng giải trình tự sản phẩm PCR. Kết quả nghiên cứu cho thấy các đoạn gen đã khuếch đại có trình tự nucleotide tương đồng cao (> 99,9 %) so với trình tự nucleotide của các gen tương ứng đã công bố trong Ngân hàng gen quốc tế. Trình tự nucleotide của đoạn gen của các chủng *Salmonella* phân lập được từ mẫu thực phẩm tại Việt Nam có những vị trí sai khác nhau so với công bố quốc tế, bao gồm 1 vị trí đối với gen *Omp* và 3 vị trí đối với gen *InvA*.

Từ khóa: *Salmonella*, gen *InvA* và *Omp*, đặc điểm sinh học phân tử.

Study on molecular-biological characteristics of *Salmonella* bacteria isolated from food in Viet Nam

Le Ha Thu, Dang Thi Thanh Son, Truong Thi Quy Duong, Truong Thi Huong Giang, Tran Thi Nhat, Chu Thi Huyen Trang, Dao Thu Thao, Le Quang Huan

SUMMARY

The study was conducted to identify and characterize specific genomes (*InvA* and *Omp* genes) of *Salmonella* that was isolated from food (pork, chicken meat) in Viet Nam by sequencing PCR products. The studied results showed that sequences of the amplified genomes possessed a high homologous nucleotide sequence (>99.9%) compared to the nucleotide sequences of the corresponding genes reported in the GenBank. The nucleotide sequence of *Salmonella* isolated from food samples in Viet Nam presented two different locations compared to the corresponding sequences in the international publications: 01 different location for the *Omp* gene and three different locations for the *InvA* gene.

Keywords: *Salmonella*, *InvA* and *Omp* genes, molecular-biological characteristic.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Salmonella do Daniel E. Salmon (1850 - 1914) phát hiện năm 1885. Năm 1880, Grafhy đã mô tả hình ảnh vi khuẩn quan sát được trên tiêu bản và là người đầu tiên phân lập được *S. typhi* vào năm 1884. Vi khuẩn *Salmonella* có sức đề kháng cao, sống sót trong nước và canh trùng có thể đến vài tháng, trong phân từ 1-5 tuần, trong nước đá 2 - 3 tháng. Loài vi khuẩn này có thể sống sót ở nhiệt độ 60°C từ 20 - 30 phút. *Salmonella* có ba loại kháng nguyên gồm:

kháng nguyên thân O, kháng nguyên lông H và kháng nguyên vỏ K. Vi khuẩn thương hàn (*S. typhi*) có kháng nguyên V (Virulence) là yếu tố chống thực bào giúp cho vi khuẩn phát triển bên trong tế bào bạch cầu. Cho đến nay đã xác định được 2339 serotype (kiểu huyết thanh) thuộc giống *Salmonella*. Các serotype này được chia theo hệ thống Koffman-White dựa trên công thức kháng nguyên O (kháng nguyên Somantie) và kháng nguyên tiên mao H (Flagella). Ngoài một số serotype được đặt tên riêng, cụ thể: *Enteritidis* (*S. enteritidis*), *Typhi* (*S. typhi*), *Paratyphi* (*S. paratyphi*),

¹ Đại học Đà Lạt

² Viện Thú y

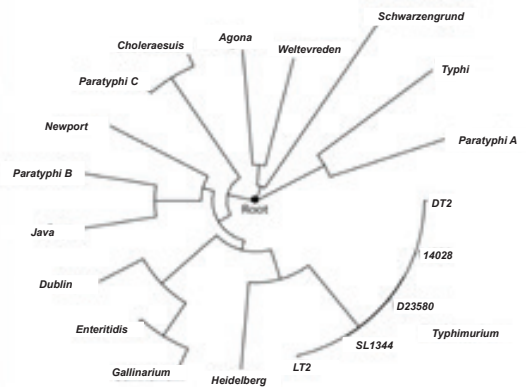
³ Viện Công nghệ Sinh học

Typhimurium (*S.typhimurium*). Hầu hết các serotype khác được ký hiệu bằng công thức kháng nguyên. Toàn bộ loài *Salmonella* đều có khả năng gây bệnh chủ yếu theo đường tiêu hóa. Tùy từng loài, *Salmonella* có thể chỉ gây bệnh cho người, chỉ gây bệnh cho động vật và vừa lây bệnh cho người, vừa lây bệnh cho động vật.

Kết quả nghiên cứu từ nhiều công trình khoa học trên thế giới đã khẳng định *Salmonella* rất phổ biến ô nhiễm trong các loại thực phẩm tươi có nguồn gốc động vật như thịt lợn, thịt gia cầm (Antunesa *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2014; Bai *et al.*, 2015). Vì vậy việc phát hiện nhanh vi khuẩn *Salmonella* trong thực phẩm là hết sức cần thiết, nhằm ngăn chặn các vụ ngộ độc thực phẩm, đảm bảo sức khỏe cộng đồng. Theo ước tính, có 75% trường hợp ở người mắc phải bệnh do *Salmonella* là do ăn phải những thức ăn bị nhiễm khuẩn bao gồm thịt lợn và thịt gà (Kent *et al.*, 1981). Thống kê theo thời gian từ 1990- 2000, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* chiếm khoảng 70% tổng số *Salmonella* được phân lập trên toàn thế giới (Herikstad, Tauxe, 2002). Tại Hà Lan, từ năm 1996 đến năm 2001, có 13.970 trường hợp bị ngộ độc do *Salmonella*, trong đó *S. enteritidis* chiếm tới 43,6%, *S. typhimurium* chiếm 32%.

Kết quả khảo sát của Liên minh châu Âu cũng cho thấy gà và lợn là nguồn lây nhiễm *Salmonella* sang người ở châu Âu với 42,4%. Tại Đức, khoảng 20% số ca nhiễm bệnh do *Salmonella* ở người có nguồn gốc lây nhiễm từ lợn. Tính riêng tại Trung Quốc, bệnh do *Salmonella* là bệnh chính gây tử vong ở người, chiếm tới 75% với khoảng 30 triệu ca mắc (Wu, 2013).

Phân tích trình tự toàn bộ hệ gen đã mang lại những hiểu biết mới về phân loại *Salmonella*. Cây phát sinh loài của *S. enterica* cho thấy rằng các serovar nằm ở các nhánh sâu, bắt rễ trong cấu trúc liên kết hình ngôi sao (Hình 1). Chiều dài của mỗi nhánh tỷ lệ thuận với số lượng đa hình đơn nucleotide (SNP) và đại diện cho mức độ phân kỳ.



Hình 1. Mối quan hệ phát sinh loài *S. enterica* và *S. typhimurium*

S. enteritidis và *S. gallinarum* có liên quan chặt chẽ, nhưng chúng thể hiện sự khác biệt đáng kể trong phạm vi chủ và gây bệnh, là phạm vi chủ rộng và chủ thể thích nghi với các loài chim *Galliformes*, làm nổi bật tiềm năng tiến hóa trong thời gian tương đối ngắn (Thomson, 2008; Langridge, 2015). *S. typhimurium* nằm trên nhánh xa gốc, tách biệt với các serovar khác, với sự đa dạng hóa ở mức độ di truyền.

Công nghệ xác định trình tự gen thế hệ mới (Next-generation-sequencing technologies) là đột phá trong việc giải trình tự gen và nhờ đó có thể xác định được trình tự toàn bộ hệ gen của hàng chục nghìn vi khuẩn gây bệnh. Các biến thể trong bộ gen, SNP, sự chèn và xóa các nucleotide dễ dàng được nhận diện, nhờ đó cho phép phân biệt các chủng đã phân lập ở độ phân giải cao nhất có thể và quan sát sự phát sinh loài trong thời gian ngắn (Bentley và Parkhill, 2015).

Các nghiên cứu trước đây đã xác định các gen đích hữu ích (các chỉ dấu di truyền) trong việc xác định *Salmonella*. Chúng bao gồm gen *fimA* (Cohen và cộng sự, 1996), *hilA* (Guo và cộng sự, 2000), *invA* (Malorny *et al.*, 2003), *ttr* (Malorny và cộng sự, 2004), và *ssaN* (Chen và cộng sự, 2010). Các chỉ dấu hiệu khác và các kết hợp chúng đã được phát triển để sử dụng trong RT-PCR (Postollec và cộng sự, 2011), và khuếch đại đẳng nhiệt vòng lặp (Kokkinos và cộng sự, 2014).

Ngoài ra, việc xác định các serovar dựa trên biến thể allele trong các gen soma và *flagellar* cũng đã được tiến hành (Yoshida và cộng sự, 2014), và các xét nghiệm sinh hóa (*Salmonella* Serogenotyping Assay, Check & Trace *Salmonella* và xMAP *Salmonella* serotyping Assay) có khả năng xác định trên 100 serovar *Salmonella enterica* phổ biến nhất trong một số trường hợp (Yoshida và cộng sự, 2016a; Yoshida và cộng sự, 2016b).

Mặc dù các phương pháp nêu trên đã được sử dụng để định tính và bán định lượng, nhưng chỉ sử dụng tối đa kết quả so sánh 100 chủng *Salmonella*, trong khi đó kết quả nghiên cứu của Laing và cộng sự (2017) đã sử dụng kết quả so sánh của gần 5000 chủng. Nghiên cứu này phân tích toàn bộ hệ gen với các chỉ dấu (marker) dự đoán và xác định được trên 400 chỉ dấu cụ thể cho các loài, cũng như những chỉ dấu khác được dự đoán cho cả hai phân loài và serovar.

Để tiếp tục hoàn thiện các phương pháp phát hiện nhanh vi khuẩn *Salmonella* trong mẫu thịt lợn/ thịt gà, chúng tôi thực hiện nghiên cứu: "Nghiên cứu xác định đặc điểm sinh học phân tử vi khuẩn *Salmonella* phân lập từ mẫu thực phẩm tại Việt Nam". Kết quả nghiên cứu đặc điểm gen đặc trưng các chủng *Salmonella* phân lập từ các địa phương khác nhau tại Việt Nam là bước quan trọng để hoàn thiện quy trình phát hiện nhanh loài vi khuẩn này.

II. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- Tách chiết DNA của một số chủng *Salmonella* phân lập được từ thịt lợn, thịt gà tại một số địa phương

- Thiết kế gen mồi (primer) và khuếch đại gen bằng kỹ thuật PCR

- Xác định trình tự nucleotide của một số gen đặc trưng cho vi khuẩn *Salmonella* ô nhiễm trong thịt lợn/thịt gà tại Việt Nam.

III. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Vật liệu và thời gian nghiên cứu

- Tổng số 18 chủng *Salmonella* phân lập được từ thịt lợn/ thịt gà thu thập tại chợ nhỏ lẻ/ lò mổ ở Nghệ An và Hà Nội

- Thời gian thực hiện nghiên cứu: Từ tháng 04 - 10/ 2018

- Địa điểm nghiên cứu: Viện Thú y và Viện Công nghệ sinh học.

3.2. Phương pháp nghiên cứu

- * Phương pháp tách chiết DNA của vi khuẩn *Salmonella*: Sử dụng Bộ Kit GeneJET Genomic DNA Purification Kit

- * Phương pháp PCR khuếch đại gen: PCR được thiết lập với 2,5 µl dung dịch DNA, 5 units GoTaq DNA polymerase (Promega Corp., USA), 1× GoTaq PCR dung dịch đệm (chứa 1,5 mM MgCl₂), 0,2 mM PCR hỗn hợp nucleotide (dNTP) (Promega Corp., USA), và 0,6 µM DNA primers và nước cất đủ tới thể tích 50 µl. Mẫu đối chứng âm sử dụng dung dịch PBS thay cho dung dịch DNA.

Chu trình nhiệt của PCR cụ thể: Một chu kỳ, 95°C trong 2 phút, sau đó thực hiện 30 chu kỳ phản ứng nhiệt: biến tính (95°C, 30s), bắt cặp (50°C, 30s), kéo dài (72 °C, 45s). Tiếp theo, một chu kỳ: 72°C thời gian 7 min, sau cùng lưu giữ ở 4°C.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng điện di trên gel agarose và sau đó sử dụng QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Ltd, UK). Sản phẩm PCR sau tinh sạch được sử dụng để xác định trình tự nucleotide.

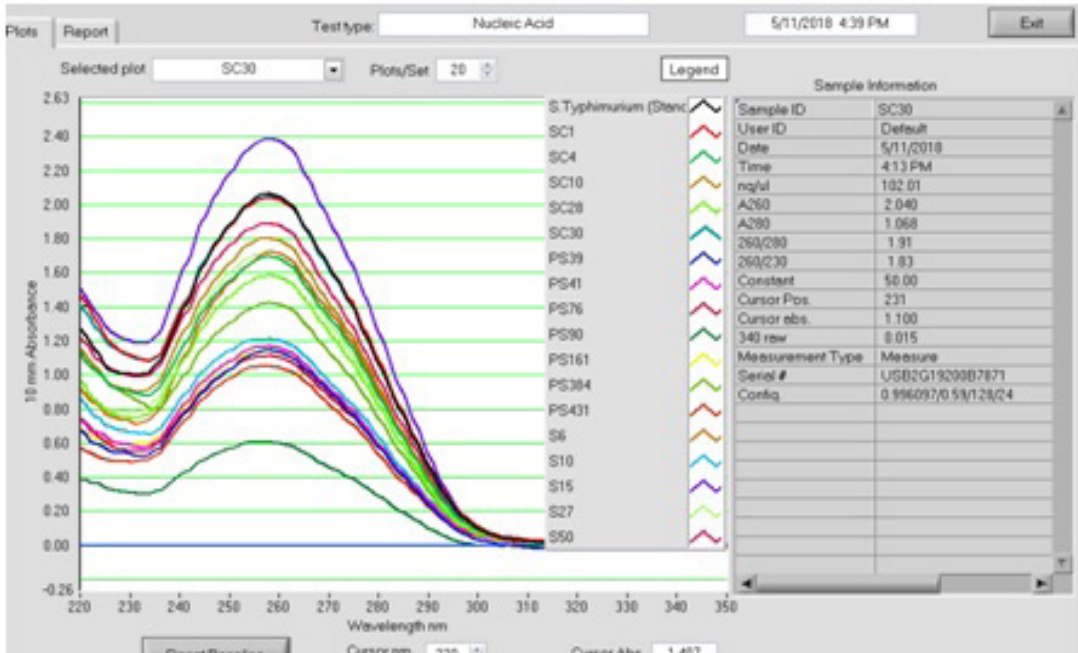
IV. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

4.1. Kết quả tách chiết DNA các chủng *Salmonella* đại diện phân lập được

18 chủng *Salmonella* đại diện cho các type huyết thanh phân lập được từ mẫu thịt lợn/thịt gà tại Nghệ An và Hà Nội, bao gồm các serovar *S. typhimurium*: 2 chủng; *S. derby*: 2 chủng; *S. agona*: 3 chủng; *S. weltevreden*: 1 chủng; *S. rissen*: 1 chủng; *S. london*: 4 chủng; *S. newport*: 1 chủng; *S. anatum*: 1 chủng;

S. bargny: 2 chủng; và 1 chủng chuẩn ATCC (*S. typhimurium*) được tách chiết DNA bằng Bộ Kit

GeneJET Genomic DNA Purification Kit. Kết quả được thể hiện tại biểu đồ 1.



Biểu đồ 1. Kết quả kiểm tra nồng độ DNA của các chủng Salmonella phân lập được

Kết quả cho thấy tất cả các mẫu được tách chiết đảm bảo nồng độ DNA dùng cho phản ứng PCR. Hệ số pha loãng đạt được tại bước sóng 260/230 của các mẫu từ 1,61 - 2,35, so với hệ số chuẩn từ 1,7- 2,0. Mẫu tách chiết đạt độ tinh sạch cao (biểu đồ 1), không bị tạp nhiễm.

4.2. Khuếch đại gen bằng kỹ thuật PCR, Realtime-PCR

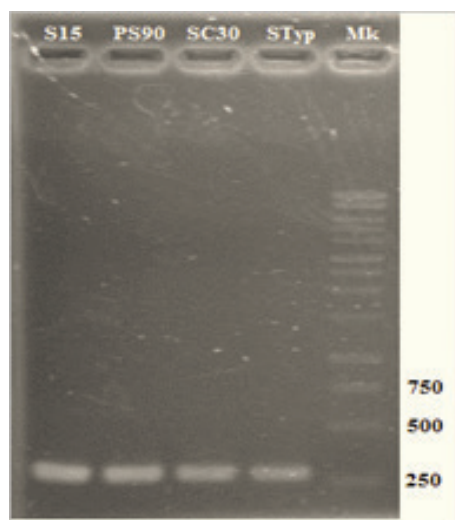
Phản ứng PCR được thực hiện theo quy trình thường quy và sản phẩm PCR được tinh sạch bằng điện di trên gel agarose và sau đó là QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Ltd, UK). Sản phẩm PCR sau tinh sạch được sử dụng để xác định trình tự nucleotide. Kết quả PCR và tinh sạch sản phẩm PCR được thể hiện trên hình 2 và bảng 1.

Phân tích trình tự toàn bộ hệ gen đã mang lại những hiểu biết mới về phân loại *Salmonella*. Cây phát sinh loài của *S. enterica* cho thấy rằng các serovar nằm ở các nhánh sâu bắt rễ trong cấu

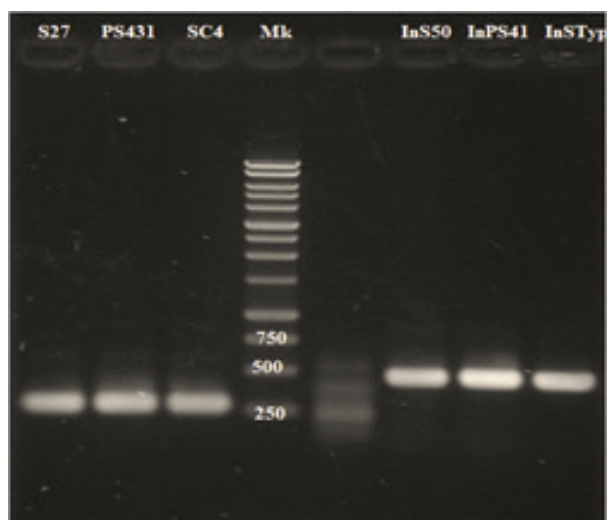
trúc liên kết hình ngôi sao (hình 2). Chiều dài của mỗi nhánh là tỷ lệ thuận với số lượng đa hình đơn nucleotide (SNP) và đại diện cho mức độ phân kỳ.

S. enteritidis và *S. gallinarum* có liên quan chặt chẽ, nhưng chúng thể hiện sự khác biệt đáng kể trong phạm vi chủ và gây bệnh, là phạm vi chủ rộng và chủ thể thích nghi với các loài chim *Galliformes*, làm nổi bật tiềm năng tiến hóa trong thời gian tương đối ngắn (Thomson, 2008; Langridge, 2015). *S. Typhimurium* nằm trên nhánh xa gốc, tách biệt với các serovar khác, với sự đa dạng hóa ở về mức độ di truyền.

Công nghệ xác định trình tự gen thế hệ mới (Next-generation-sequencing technologies) là đột phá trong việc giải trình tự gen và nhờ đó có thể xác định được trình tự toàn bộ hệ gen của hàng chục nghìn vi khuẩn gây bệnh. Các biến thể trong bộ gen, SNP, sự chèn và xóa các nucleotide dễ dàng được nhận diện, nhờ đó cho phép phân biệt các chủng đã phân lập ở độ phân giải cao nhất có thể và quan sát sự phát sinh loài trong thời gian ngắn (Bentley và Parkhill, 2015).



Hình 2a. Ảnh điện di kiểm tra PCR gen *Inva* và gen *Omp* trên gel agarose



Hình 2b. Ảnh điện di kiểm tra PCR gen *Inva* trên gel agarose

Bảng 1. Kết quả xác định nồng độ DNA sau khi tinh sạch sản phẩm PCR

STT	Tên mẫu	Tên gen được khuếch đại PCR	Nồng độ DNA sau tinh sạch (ng/μl)	STT	Tên mẫu	Tên gen được khuếch đại PCR	Nồng độ DNA sau tinh sạch (ng/μl)
1	S6	Omp	4813	1	InS6	Inva	4830
2	S10	Omp	4787	2	InS10	Inva	4868
3	S15	Omp	4768	3	InS15	Inva	4864
4	S27	Omp	4826	4	S27	Inva	4670
5	S50	Omp	4806	5	S50	Inva	4819
6	PS39	Omp	4759	6	PS39	Inva	4790
7	PS41	Omp	4779	7	PS41	Inva	4927
8	PS76	Omp	4767	8	PS76	Inva	4831
9	PS90	Omp	4819	9	PS90	Inva	4752
10	PS161	Omp	4903	10	PS161	Inva	4827
11	PS384	Omp	4829	11	PS384	Inva	4840
12	PS431	Omp	4849	12	PS431	Inva	4845
13	SC1	Omp	4776	13	SC1	Inva	4731
14	SC4	Omp	4813	14	SC4	Inva	4810
15	SC10	Omp	4712	15	SC10	Inva	4710
16	SC28	Omp	4782	16	SC28	Inva	4817
17	SC30	Omp	4847	17	SC30	Inva	4794
18	Styp ATCC	Omp	4855	18	STyp	Inva	4732

Các nghiên cứu trước đây đã xác định các gen đích hữu ích (các chỉ dấu di truyền) trong việc

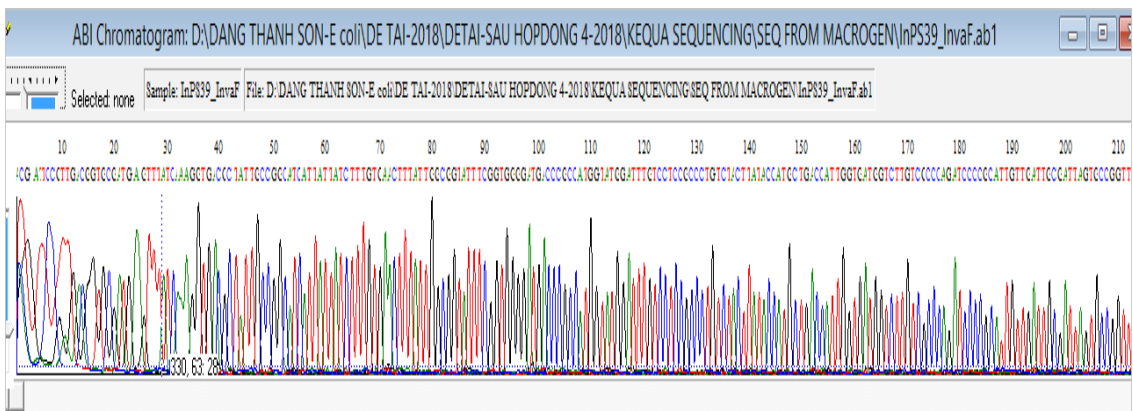
xác định *Salmonella*. Chúng bao gồm gen *fimA* (Cohen và cộng sự, 1996), *hilA* (Guo và cộng sự,

2000), *invA* (Malorny et al., 2003), *trr* (Malorny và cộng sự, 2004; Chen và cộng sự, 2010). Các chỉ dấu hiệu khác và các kết hợp chúng đã được phát triển để sử dụng trong RT-PCR (Postollec và cộng sự, 2011), và khuếch đại đẳng nhiệt vòng lặp (Kokkinos và cộng sự, 2014). Ngoài ra, việc xác định các serovar dựa trên biến thể allele trong các gen soma và *flagellar* cũng đã được tiến hành (Yoshida và cộng sự, 2014), và các xét nghiệm sinh hóa (*Salmonella* Serogenotyping Assay, Check & Trace *Salmonella* và xMAP *Salmonella* serotyping Assay) có khả năng xác định trên 100 serovar *Salmonella enterica* phổ biến nhất trong một số trường hợp (Yoshida và cộng sự, 2016a;

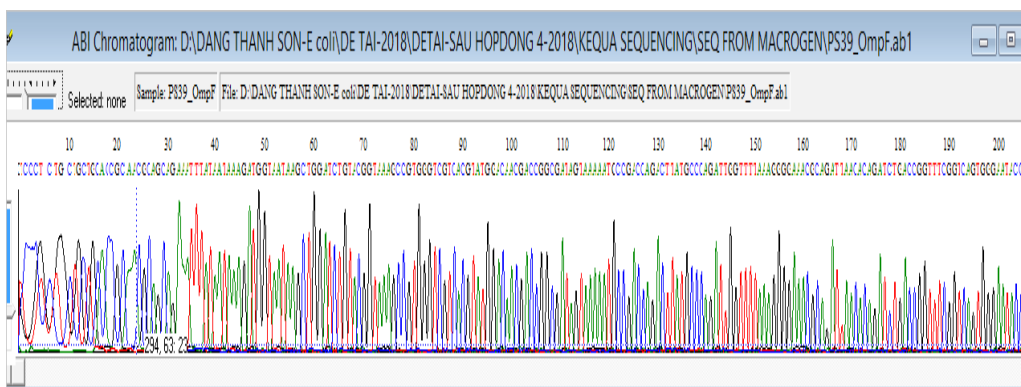
Yoshida và cộng sự, 2016b).

Mặc dù các phương pháp nêu trên đã được sử dụng để định tính và bán định lượng, nhưng chỉ sử dụng tối đa kết quả so sánh 100 chủng *Salmonella*, trong khi đó kết quả nghiên cứu của Laing và cộng sự (2017) đã sử dụng kết quả so sánh của gần 5000 chủng. Nghiên cứu này phân tích toàn bộ hệ gen với các chỉ dấu (marker) dự đoán và xác định được trên 400 chỉ dấu cụ thể cho các loài, cũng như những chỉ dấu khác được dự đoán cho cả hai phân loài và các serovar.

4.3. Xác định trình tự nucleotide của một số gen đặc trưng của vi khuẩn *Salmonella* spp ô nhiễm trong thịt lợn/thịt gà tại Việt Nam



Gen *InvA*



Gen *Omp*

Kết quả sequence một số mẫu và so sánh với trình tự nucleotide đã công bố trong Ngân hàng gen quốc tế.

Kết quả cho thấy các đoạn gen đã khuếch đại có trình tự nucleotide tương đồng cao (> 99,9 %) so với trình tự nucleotide của các gen tương

ứng đã công bố trong Ngân hàng gen quốc tế. Không có sự sai khác giữa gen *InvA* và *Omp* giữa các chủng phân lập tại Việt Nam. Tuy nhiên, trình tự nucleotide của các gen đặc trưng cho *Salmonella* spp. phân lập được tại Việt Nam có những vị trí sai khác: 1 vị trí đối với gen *Omp* và 3 vị trí đối với gen *InvA*.

V. KẾT LUẬN

Sản phẩm DNA đạt nồng độ và độ tinh sạch cần thiết phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Hai cặp mồi được thiết kế để khuếch đại PCR cho 2 gen: *InvA* và *Omp* đặc trưng *Salmonella* có tính đặc hiệu và độ nhạy cao

Sản phẩm PCR có độ tinh sạch cao, đảm bảo cho xét nghiệm về xác định trình tự các *InvA* và *Omp*

Các đoạn gen đã khuếch đại có trình tự nucleotide tương đồng cao (> 99,9 %) với trình tự nucleotide của các gen tương ứng đã công bố trong Ngân hàng gen quốc tế.

Trình tự nucleotide của các gen đặc trưng cho *Salmonella* spp. phân lập được tại Việt Nam có những vị trí sai khác: 1 vị trí đối với gen *Omp* và 3 vị trí đối với gen *InvA*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lunguya O, Lejon V, Phoba M- F, Bertrand S, Vanhoof R, Glupczynski Y, et al. 2013. Antimicrobial resistance in invasive nontyphoid *Salmonella* from the Democratic Republic of the Congo: Emergence of decreased fluoroquinolone susceptibility and extended-spectrum Beta lactamases. *PLoS neglected tropical diseases*; 7: e2103. pmid:23516651
2. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, et al. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*; 50: 882–889. pmid:20158401
3. M'ikanatha NM, Sandt CH, Localio AR, Tewari D, Rankin SC, Whichard JM, et al. 2010. Multidrug-resistant *Salmonella* isolates

from retail chicken meat compared with human clinical isolates. *Foodborne pathogens and disease*. 7: 929–934

4. Cohen, H., Mechanda, S., and Lin, W. (1996). PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4303–4308.
5. Guo, X., Chen, J., Beuchat, L. R., and Robert, E. (2000). PCR detection of *Salmonella enterica* serotype montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hlyA*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5248–5252. doi: 10.1128/AEM.66.12.5248-5252.2000.Updated
6. Kokkinos, P. A., Ziros, P. G., Bellou, M., and Vantarakis, A. (2014). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the detection of *Salmonella* in food. *Food Anal. Methods* 7, 512–526. doi: 10.1007/s12161-013-9748-8
7. Laing C.R., Whiteside M.D., and Gannon V.P.J., (2017). Pan-genome Analyses of the Species *Salmonella enterica*, and Identification of Genomic Markers Predictive for Species, Subspecies, and Serovar. *Front. Microbiol.* 8:1345. doi: 10.3389/fmicb.2017.01345
8. Langridge GC, Fookes M, Connor TR, Feltwell T, et al., 2015. Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 863– 868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416707112>.
9. McDonald, N. D., Lubin, J. B., Chowdhury, N., and Boyd, E. F. (2016). Host-derived sialic acids are an important nutrient source required for optimal bacterial fitness *in vivo*. *mBio* 7:e02237-15. doi: 10.1128/mBio.02237-15
10. Ng, K. M., Ferreyra, J. A., Higginbottom, S. K., Lynch, J. B., Kashyap, P. C., Gopinath, S., et al. (2013). Microbiota-liberated host sugars facilitate postantibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* 502, 96–99. doi: 10.1038/nature12503

Ngày nhận 24-11-2018

Ngày phản biện 5-12-2018

Ngày đăng 1-1-2019