

KHẢO SÁT MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN GEN ĐỘC CỦA MỘT SỐ CHỦNG *Salmonella* PHÂN LẬP TỪ CÁC MẪU THỊT TẠI HÀ NỘI

Nguyễn Thị Hoài Thu¹, Nguyễn Thanh Việt², Nghiêm Ngọc Minh¹, Võ Thị Bích Thủy^{1*}

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

²Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Xét nghiệm Công nghệ cao, Bệnh viện 103, Học viện Quân y

TÓM TẮT: *Salmonella* là một trong những nguyên nhân chính gây ngộ độc thực phẩm trên toàn thế giới, đặc biệt là ở các nước đang phát triển. Tính độc của *Salmonella* và phản ứng của chúng với vật chủ là một quá trình phức tạp, liên quan đến các yếu tố gây độc để vượt qua sự phòng thủ của vật chủ. Mục đích của nghiên cứu này là phát hiện các gen độc và đánh giá mức độ biểu hiện các gen độc của năm chủng *Salmonella* (gồm Enteritidis, Albany, Typhimurium, Hadar và Derby) phân lập từ các mẫu thịt tại các chợ bán lẻ ở Hà Nội. Kết quả chủng *Salmonella* Enteritidis và *Salmonella* Typhimurium dương tính 100% với 7 gen độc *spiA*, *spvB*, *sitC*, *sifA*, *sipB*, *pagC* và *invA* trong nghiên cứu; *Salmonella* Hadar và *Salmonella* Derby dương tính với 6 gen, ngoại trừ gen *spvB*; *Salmonella* Albany dương tính với duy nhất gen *pagC*. Mức độ biểu hiện của bảy gen độc này so với gen đối chứng *16S rRNA* là khác nhau giữa năm chủng *Salmonella* với mức độ sai khác đáng tin cậy ($P < 0,05$). Các kết quả phân tích mức độ biểu hiện của bảy gen độc trong 5 typ *Salmonella* cho thấy *Salmonella* Hadar có các gen độc biểu hiện mạnh nhất, tiếp đến là *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Typhimurium và cuối cùng là *Salmonella* Albany. Kết quả phân tích sinh học phân tử sẽ cung cấp thêm các số liệu về sự biểu hiện của các gen gây độc trong các chủng *Salmonella* phân lập được trên thực phẩm tại Hà Nội.

Từ khóa: *Salmonella* spp., gen độc lực, RT-PCR.

MỞ ĐẦU

Salmonella là trực khuẩn gram âm, không vỏ, không nha bào, có lông, có thể tồn tại và sinh sản trong tế bào, kể cả trong đại thực bào, có sức đề kháng tốt, tồn tại ở ngoại cảnh trong đất được vài tháng, trong nước và trong phân được vài tuần, trong thực phẩm đông lạnh được 2-3 tháng. *Salmonella* sống được cả ở trong các thực phẩm có nồng độ muối, đường cao, ở nhiệt độ 100°C sau 5 phút mới diệt được vi khuẩn. *Salmonella* spp. là vi khuẩn gây bệnh Salmonellosis và cũng là nguyên nhân phổ biến gây bùng phát ngộ độc thực phẩm và gây bệnh ở người xảy ra ở những nước phát triển và đang phát triển (Alvarez, 2004; Amini et al., 2010). Salmonellosis ảnh hưởng tới 1,3 tỉ người trên thế giới và ước tính khoảng 3 triệu người chết mỗi năm do nhiễm độc thức ăn bởi *Salmonella* (Non-typhoidal Salmonellosis - NTS) (Bennett et al., 1998). Hậu quả của bệnh là do phơi nhiễm với *Salmonella* spp. với các triệu chứng từ nhẹ đến nghiêm trọng và thậm chí là tử vong. *Salmonella* spp. có ở động vật nuôi bao gồm cả chim và một số động vật hoang dã (Smith et al., 2015). *Salmonella* spp được phân lập từ thịt

tươi, gia cầm và các sản phẩm từ gia cầm, sữa và các chế phẩm từ sữa và trong môi trường (Chiu et al., 2002).

Các gen độc lực của *Salmonella* có mặt ở nhiễm sắc thể, plasmid và tiền thực khuẩn thể của vi khuẩn, *Salmonella* gây nhiễm trùng nhiễm độc thực phẩm (SPIs) đóng vai trò quan trọng trong việc bám dính, xâm nhiễm, sống sót nội bào, nhiễm trùng hệ thống, kháng kháng sinh, tạo độc tố và hấp thu Mg và Fe (Kim, Ju Lee, 2017). Các gen mục tiêu *invA*, *orgA*, *prgH*, *spaN* (*invJ*), *tolC*, *sipB*, *pagC*, *msgA*, *spiA*, *sopB*, *lpfC*, *pefA*, *spvB* và *sifA* mã hóa cho các protein liên quan đến tính xâm nhiễm, như xâm nhiễm tế bào và sự bám dính hoặc tạo ra nhung mao (Skyberg et al., 2006). Một số gen mã hóa cho các đặc tính khác được cho là quan trọng đối với tính độc lực gồm *sitC* (Janakiraman, Slauch, 2000) và *iroN* (Bäumler et al., 1998), cả hai gen đều liên quan đến việc thu nhận sắt. Tất cả các gen ngoại trừ *pefA*, *iroN*, *cdtB*, *sipB* và *spaN* (*invJ*) đều được chứng minh là không thể thiếu đối với tính độc lực đầy đủ của *Salmonella* trong mô hình chuột (Skyberg et al., 2006).

Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đã lựa chọn bảy gen độc lực quan trọng của *Salmonella* gồm *spiA*, *spvB*, *sitC*, *sifA*, *sipB*, *pagC* và *invA* để kiểm tra sự xuất hiện và đánh giá mức độ biểu hiện của từng gen giữa các chủng *Salmonella* khác nhau, từ đó cung cấp thêm những thông tin cần thiết cho các nhà quản lý trong công tác phòng và điều trị bệnh.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Năm chủng *Salmonella* (gồm Enteritidis, Albany, Typhimurium, Hadar và Derby) được phân lập từ các mẫu thịt (gồm thịt bò, thịt lợn và thịt gà) từ các chợ bán lẻ ở Hà Nội do Phòng Hệ gen học Vi sinh, Viện Nghiên cứu Hệ gen cung cấp. Các loại hóa chất được dùng trong nghiên cứu như: tách chiết RNA (bộ kit RNeasy Mini, Qiagen, CHLB Đức), tổng hợp cDNA (bộ kit Promega, Hoa Kỳ), thành phần chạy phản ứng PCR (Thermo Scientific, Hoa Kỳ).

Phương pháp tách chiết RNA tổng số

Các chủng vi khuẩn *Salmonella* được lựa chọn, nuôi cấy trên môi trường thạch dinh dưỡng Nutrient Agar. Tăng sinh trong môi trường Brain Heart Infusion Broth (BHI) để thu được canh khuẩn đạt nồng độ 10^8 dùng tách RNA.

Quy trình tách RNA thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit RNeasy Mini (Qiagen, CHLB Đức). Tóm tắt quá trình đó như sau: Lấy 1 ml dịch canh khuẩn đạt nồng độ 10^8 vào ống eppendorf 1,5 ml, ly tâm 14.000 rpm/ 10 phút/ 4°C. Đổ phần dịch ở trên, giữ lại phần cặn dưới đáy ống. Thêm 1 ml dung dịch TRIzol vào ống eppendorf 1,5 ml. Nghiền cặn bằng máy sonicate trong 30 giây để tan hoàn toàn. Thêm 0,2 ml chloroform/1 ml TRIzol. Trộn đều phần dịch trong 15 giây (bằng máy vortex). Ly tâm 14.000 rpm/ 10 phút/ 4°C. Chuyển toàn bộ phần RNA ở phía trên (pha nước, chiếm khoảng 60% thể tích) sang ống eppendorf 1,5 ml mới. Tủa RNA với Isopropanol (Isopropyl alcohol, C₃H₈O). Thêm 0,6 ml Isopropanol vào ống chứa RNA ở trên. Đảo nhẹ ống bằng tay 6 - 8 lần. Ủ ống ở nhiệt độ -20°C/ qua đêm hoặc trong 3 giờ. Ly tâm 14.000 rpm/ 10 phút/ 4°C. Đổ phần dịch ở trên, giữ lại phần cặn dưới đáy ống (cặn đó chính là RNA). Rửa cặn RNA bằng cồn Ethanol

75% (cồn Ethanol 100% pha loãng bằng DEPC-treated water): Thêm 1 ml cồn Ethanol 75% vào ống eppendorf có chứa cặn RNA, lắc nhẹ bằng tay, ly tâm 6.000 rpm/5 phút/4°C. Đổ phần dịch ở trên, giữ lại phần cặn dưới đáy ống. Để khô cặn ở nhiệt độ phòng trong 1-2 phút. Pha loãng cặn RNA trong 30-60 µl RNase-free water. Ủ ống eppendorf ở 55-60°C/5 phút, lấy ra đặt ngay vào hộp đá trong 5 phút. Mẫu RNA được kiểm tra nồng độ, độ tinh sạch (OD 260/280) trên máy đo quang phổ khả kiến (NanoDrop) và các hệ số lắng 5S, 18S và 28S của rRNA bằng điện di sản phẩm trên gel agarose 1%. Hiệu chỉnh mẫu RNA (RNA_{adj}) đạt nồng độ 1 µg/ µl. Bảo quản sản phẩm ở nhiệt độ âm sâu (-80°C) cho đến khi thực hiện các bước tiếp theo.

Phương pháp tổng hợp cDNA

Các bước tổng hợp cDNA được thực hiện theo hướng dẫn của Bộ sản phẩm hãng Promega (Hoa Kỳ). Tóm tắt quá trình như sau: Mẫu RNA_{adj} được lấy ra từ tủ âm sâu (-80°C), đặt vào hộp đá để mẫu tan tự nhiên. Biến tính hỗn hợp RNA_{adj} (2 µl) ở nhiệt độ 70°C/ 5 phút, lấy ra đặt ngay vào hộp đá trong 5 phút. Chuẩn bị hỗn hợp tổng hợp cDNA gồm: 5 X buffer (4 µl); 0.1 MDTT (2 µl); dNTP (2 µl); Random Primer (2 µl); RNase Inhibitor (0,5 µl); M MLV-RT (0.8 µl) và DEPC-DW (6,7 µl). Lượng các thành phần trên được tính cho 1 mẫu. Cho 18 µl hỗn hợp cDNA + 2 µl RNA_{adj} ủ ở nhiệt độ 37°C/ 60 phút. Tiếp tục biến tính sản phẩm ở nhiệt độ 95°C/ 5 phút, lấy ra đặt ngay vào hộp đá trong 5 phút. Sản phẩm cDNA được bảo quản ở -20°C cho đến khi thực hiện các bước tiếp theo.

Phương pháp chạy RT-PCR

Phản ứng RT-PCR để phát hiện các gen độc lực được thực hiện với các thành phần phản ứng theo hướng dẫn sử dụng của hãng Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ: 2 µl Dream Taq Buffer 10X; 1 µl hỗn hợp dNTP (2,5 pm/µl); 0,5 µl mỗi xuôi (10 pmol/µl); 0,5 µl mỗi ngược (10 pmol/µl); 0,15 µl Taq polymerase (5U/µl); 3 µl mẫu cDNA (1 µg/ µl); bổ sung nước khử ion để tổng thể tích phản ứng là 20 µl. Chu trình nhiệt gồm: 94°C/4 phút, (94°C/30 giây; nhiệt độ gắn môi/45 giây; 72°C/1 phút) x 25 chu kỳ; 72°C/7 phút.

Bảng 1. Thông tin các cặp mồi sử dụng trong phản ứng PCR để phát hiện các gen độc lực của các chủng *Salmonella* (Skyberg et al., 2006)

Gen	Chức năng của gen	Trình tự mồi (5'-3')	Kích thước sản phẩm (bp)	Nhiệt độ gắn mồi (°C)
<i>16S rRNA</i>	Gen đặc trưng của vi khuẩn	F:GCCTACGGGAGGCAGCAG R:CCGTCAATTCMTTGTGAGTTT	550	56 °C
<i>invA</i>	Nhận diện/xâm nhiễm vật chủ	F:CTGGGCGGTGGGTTTTGTTTGTCTTCTCTAT T R:AGTTTCTCCCCCTCTTCATGCGTTACCCC	1070	57 °C
<i>sifA</i>	Sự hình thành cấu trúc dạng sợi	F:TTTGCCGAACGCGCCCCACACG R:GTTGCCTTTTCTTGCGCTTCCACCCATCT	449	59 °C
<i>sipB</i>	Đi vào các tế bào không thực bào	F:GGACGCCCGCCGAAAACTCTC R:ACACTCCCGTCGCCGCCTTCACAA	875	58 °C
<i>spiA</i>	Sống sót bên trong đại thực bào	F:CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG R:CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	550	57 °C
<i>spvB</i>	Phát triển bên trong vật chủ	F:CTATCAGCCCCGACGGAGAGCAGTTTTTA R:GGAGGAGGCGGTGGCGGTGGCATCATA	717	58 °C
<i>pagC</i>	Sống sót bên trong đại thực bào	F:CGCCTTTTCCGTGGGGTATGC R:GAAGCCGTTATTTTTGTAGAGGAGATGTT	454	55 °C
<i>sitC</i>	Thu nhận sắt	F:CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC R:CGGGGCGAAAATAAAGGCTGTGATGAAC	768	58 °C

Phương pháp xử lý số liệu

Mức độ biểu hiện của các gen được phân tích bằng chương trình phân tích Quantity One (Gel Doc 1000, version 4.6.3, Bio-Rad, Hercules, CA). Các số liệu được thống kê bằng phương pháp phân tích phương sai một nhân tố (One-way ANOVA). Sự khác biệt có ý nghĩa giữa các gen độc lực và gen *16S rRNA* của các chủng *Salmonella* được phân tích bằng các hệ số trong hồi quy bội tuyến tính (Tukey's Multiple Regression Test) với độ sai khác $P < 0,05$ (GraphPad Prism Version 5.01).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

RNA tổng số sau khi tách chiết sẽ được tinh sạch và đọc kết quả bằng chương trình Quantity One program (Gel Doc EQ; Bio-Rad, Hercules, CA) (bảng 2). Các mẫu RNA có giá trị tỷ lệ hấp phụ (chỉ số tinh khiết của mẫu) 260 nm/ 280 nm đạt từ 1,8-2,0 nm sẽ được lựa chọn cho thí nghiệm tiếp theo là: *Salmonella* Enteritidis 1 (SE1), *Salmonella* Albany 3 (SA3), *Salmonella* Typhimurium 1 (ST1), *Salmonella* Hadar 3 (SH3), và *Salmonella* Derby 2 (SD2). Nồng độ RNA được pha loãng để đạt 1µg /µl đồng nhất

giữa các chủng sử dụng cho tổng hợp cDNA. Sản phẩm cDNA được sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình RT-PCR với các cặp mồi gen độc lực và mồi gen *16S rRNA*.

Bảng 2. Nồng độ các mẫu RNA được tách từ canh khuẩn các chủng *Salmonella*

Mẫu RNA tổng số	Ký hiệu	Nồng độ (ng/ µl)	A260/280
<i>Salmonella</i> Enteritidis	SE1	1255,2	1,87
<i>Salmonella</i> Enteritidis	SE2	1312,8	1,64
<i>Salmonella</i> Enteritidis	SE3	2962,9	2,02
<i>Salmonella</i> Albany	SA1	987,7	1,73
<i>Salmonella</i> Albany	SA2	700,9	1,43
<i>Salmonella</i> Albany	SA3	1005,8	1,53
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ST1	1048,0	1,96
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ST2	1556,0	1,46
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ST3	971,8	1,81
<i>Salmonella</i> Hadar	SH1	1673,4	1,55
<i>Salmonella</i> Hadar	SH2	1042,3	1,76
<i>Salmonella</i> Hadar	SH3	1785,6	1,79
<i>Salmonella</i> Derby	SD1	763,3	2,00
<i>Salmonella</i> Derby	SD2	1689,4	1,91
<i>Salmonella</i> Derby	SD3	1152,9	1,92

Bảng 3. Tổng hợp các gen độc lực xuất hiện trong chủng *S. enteritidis*, *S. albany*, *S. typhimurium*, *S. hadar* và *S. derby*

<i>Salmonella</i> serovar	Gen độc lực							Tỷ lệ (%)
	<i>spiA</i>	<i>spvB</i>	<i>sitC</i>	<i>sifA</i>	<i>sipB</i>	<i>pagC</i>	<i>invA</i>	
<i>S. Enteritidis</i>	+	+	+	+	+	+	+	7/7 (100%)
<i>S. Albany</i>	-	-	-	-	-	+	-	1/7 (14,29%)
<i>S. Typhimurium</i>	+	+	+	+	+	+	+	7/7 (100%)
<i>S. Hadar</i>	+	-	+	+	+	+	+	6/7 (85,71%)
<i>S. Derby</i>	+	-	+	+	+	+	+	6/7 (85,71%)
Tỷ lệ (%)	4/5 (80%)	2/5 (40%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)	5/5 (100%)	4/5 (80%)	

Trong nhiều loại vi khuẩn đường ruột, tính gây độc có thể được quy định bởi một vùng đơn lẻ của bộ gen (Groisman, Ochman, 1997). Tuy nhiên, với *Salmonella* nội bào tùy ý yêu cầu một số lượng lớn gen phân bố xung quanh nhiễm sắc thể (Groisman, Ochman, 1997). Trong số những gen đó có nhiều gen cũng được tìm thấy trong những chủng gây bệnh và không gây bệnh của *E. coli*, điều đó cho thấy, chúng có thể không hữu ích trong việc phát hiện đặc hiệu các gen gây độc của *Salmonella*. Vì vậy, trong nghiên

cứu này chúng tôi sẽ tập trung vào một số gen đặc trưng cho tính gây độc của *Salmonella*. Cả 7 gen ngoại trừ *sipB* đều là những gen bắt buộc đối với tính độc lực đầy đủ của *Salmonella* trong mô hình chuột (Skyberg et al., 2006).

Theo kết quả nghiên cứu được tổng hợp trong bảng 3 cho thấy gen *pagC* xuất hiện 100% (5/5) ở 5 typ *Salmonella* nghiên cứu. Các gen *spiA*, *sitC*, *sifA*, *sipB* và *invA* xuất hiện 80% (4/5), gen *spvB* xuất hiện 40% (2/5). Trong đó,

chủng *S. Enteritidis* và *S. Typhimurium* dương tính 100% với 7 gen này; *S. Hadar* và *S. Derby* dương tính 85,71% (6/7), ngoại trừ gen *spvB*; *S. Albany* dương tính với duy nhất gen *pagC* chiếm 14,29% (1/7).

Sử dụng gen *16S rRNA* làm đối chứng để so sánh mức độ biểu hiện mạnh hay yếu của từng gen độc lực giữa năm chủng *Salmonella* trong nghiên cứu này. Mức độ biểu hiện của bảy gen độc lực (*spiA*, *spvB*, *sitC*, *sifA*, *sipB*, *pagC* và *invA*) của *Salmonella* spp. chiếm tỷ lệ từ 22,04% đến 51,17%. Trong đó, biểu hiện mạnh nhất là gen *sitC*, trung bình khoảng 51,17% (hình 1), sau đó đến *pagC* là 49,38% (hình 2), *sifA* là 47,48% (hình 3), *sipB* là 41,90% (hình 4), *spiA* là 32,25% (hình 5), *invA* là 28,92% (hình 6) và *spvB* là 22,04% (hình 7). Gen độc lực *invA* biểu hiện mạnh nhất ở chủng *S. Hadar* với 91,72%, cao gấp 11,61 lần so với chủng *S. Typhimurium*, gấp 10,84 lần chủng *S. Albany*, gấp 7,4 lần chủng *S. Enteritidis* và gấp 3,85 lần chủng *S. Derby* ở mức độ sai khác đáng tin cậy ($P < 0,05$) (hình 6). Mức độ biểu hiện của gen *invA* ở các typ *Enteritidis*, *Albany* và *Typhimurium* là ngang nhau, không có sự khác biệt giữa ba typ và đều biểu hiện ở mức thấp, trung bình là 9,59%.

Kết quả phân tích biểu hiện của gen *spiA* cũng cho kết quả tương tự như trên gen *invA*; gen *spiA* cho biểu hiện mạnh nhất ở *S. Hadar* (88,71%), riêng ở ba typ *Enteritidis*, *Albany* và *Typhimurium* là không có sự khác biệt (hình 5). Gen *sifA* biểu hiện mạnh nhất ở chủng *S. Hadar* (97,24%), cao hơn so với chủng *S. Albany*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Derby* lần lượt là 7,35; 3,68; 1,97 và 1,90 lần với $P < 0,05$ (hình 3). Mức độ biểu hiện của gen *sifA* giữa *S. Enteritidis* với *S. Derby*, giữa *S. Albany* với *S. Typhimurium* là không có sự sai khác. *S. Hadar* và *S. Enteritidis* là hai chủng có gen *pagC* biểu hiện mạnh với tỉ lệ tương ứng là 91,81% và 85,25% (hình 2). Gen *pagC* biểu hiện yếu nhất ở *S. Albany* (13,96%) kém 6,58 lần so với typ *Hadar* với $P < 0,05$.

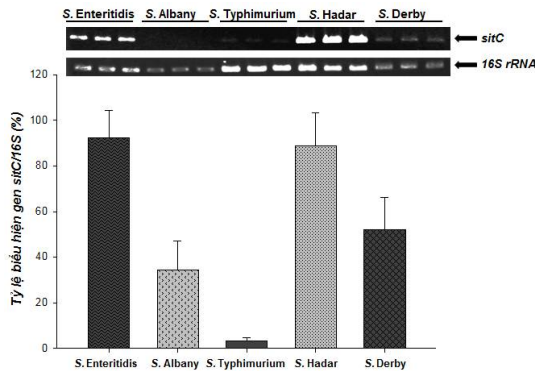
Kết quả trên hình 4 cho thấy chủng *S. Hadar* tiếp tục là chủng có biểu hiện gen *sipB* mạnh nhất (91,01%) và có sự khác biệt với bốn chủng còn lại với mức độ sai khác có ý nghĩa $P < 0,05$.

Trong khi đó theo kết quả phân tích của hệ số trong hồi quy bội tuyến tính (Tukey's Multiple Comparison Test) thì bốn chủng còn lại mức độ biểu hiện của gen *sipB* là ngang nhau. Gen *sitC* biểu hiện mạnh nhất ở typ *Enteritidis* (92,38%), sau đó là *Hadar* (88,83%). Ba typ *Albany*, *Typhimurium* và *Derby* có mức độ biểu hiện của gen *sitC* là tương đương nhau (hình 1). Typ *Enteritidis* cũng là typ có gen *spvB* biểu hiện mạnh nhất (83,44%), 4 typ còn lại có mức độ biểu hiện tương đương nhau (hình 7).

Các kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi khá tương đồng với các nghiên cứu trên thế giới như Krawiec et al. (2015), 5 *Salmonella* serovar phổ biến có trong gia cầm ở Ba Lan gồm *Enteritidis*, *Typhimurium*, *Infantis*, *Virchow* và *Hadar* đều chứa các gen *spiA*, *msgA*, *invA*, *lpfC*, *sifA*; 94,45% các chủng chứa *sitC* và *sopB*. Không có chủng *Salmonella Typhimurium* nào chứa gen *cdtB*. Ngoài ra, *Salmonella Hadar* có biểu hiện một số gen khác (*spvB*, *pagC*, *cdtB*, *sipB*, *prgA*, *spaN*, *orgA*, *tolC*, *ironN*, *sitC*, *ipfC*, *sopB* và *pefA*); *Salmonella Infantis* chứa tất cả các gen, ngoại trừ *spvB*, *pefA* và *cdtB*; *Salmonella Virchow* cũng chứa tất cả các gen, ngoại trừ *spvB*, *pefA*, *cdtB* và *tolC* (Krawiec et al., 2015). Trong báo cáo của Smith (2015), các chủng *Salmonella* spp. phân lập từ các mẫu thực phẩm ở Lào và Nigeria dương tính với gen *invA* (96,1%), gen *sitC* (50%) và không có chủng nào dương tính với gen *spvA* và *spvB* (Smith et al., 2015). Skyberg et al. (2006) khi tìm kiếm gen độc lực của *Salmonella* spp. trên hai nhóm đối tượng là gà khỏe mạnh và gà mang bệnh đã phát hiện được 11/17 gen (gồm *invA*, *orgA*, *prgH*, *tolC*, *spaN* [*invJ*], *sipB*, *sitC*, *pagC*, *msgA*, *spiA*, and *iroN*) có mặt ở tất cả các chủng phân lập. Năm gen *lpfC*, *cdtB*, *sifA*, *pefA* và *spvB* xuất hiện 10%-90% ở nhóm gà mang bệnh và 3,75%-90% ở nhóm gà khỏe mạnh. Không sự khác biệt nào đáng kể về sự xuất hiện của các gen độc lực giữa hai nhóm đối tượng trong nghiên cứu (Skyberg et al., 2006). Arunava Das (2012) đã thực hiện nghiên cứu sàng lọc các gen độc lực liên quan tới *Salmonella enterica* phân lập từ 134 mẫu thực phẩm thương mại như thịt sống của gia cầm, lợn, bò, trứng sống, sữa và bánh mì ở Ấn Độ. Kết quả là gen *invA* và *stn* có mặt 100% ở các mẫu; 51,42% gen *pefA*; 25,71%

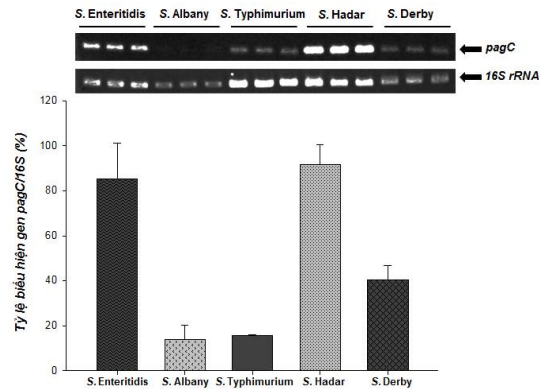
gen *sefC* và 42,85% gen *spvC*. Kết quả đã chỉ ra rằng bệnh truyền từ động vật sang người thông qua chuỗi thực phẩm đang trở thành mối nguy hiểm đối với nhân loại (Das et al., 2012).

Các kết quả phân tích của chúng tôi cho thấy, sự xuất hiện và mức độ biểu hiện của bảy gen độc lực trong chủng *Salmonella* Hadar là



Hình 1. Biểu hiện của gen *sitC* so với gen đối chứng *16S rRNA*

mạnh nhất, tiếp đến là *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Typhimurium và cuối cùng là *Salmonella* Albany. Qua các phân tích phân tử để xác định chính xác sự phân bố của các gen độc lực sẽ giúp chúng ta xây dựng các biện pháp phòng chống các mầm bệnh nguy hiểm.



Hình 2. Biểu hiện của gen *pagC* so với gen đối chứng *16S rRNA*

KẾT LUẬN

Năm chủng *Salmonella* gồm Enteritidis, Albany, Typhimurium, Hadar và Derby phân lập từ các mẫu thịt tại các chợ bán lẻ ở Hà Nội, hầu hết đều dương tính với các gen độc lực được kiểm tra là *spiA*, *spvB*, *sitC*, *sifA*, *sipB*, *pagC* và *invA*. Trong 5 typ *Salmonella* thì chủng *Salmonella* Hadar có các gen độc lực biểu hiện mạnh nhất, tiếp đến là *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Typhimurium và cuối cùng là *Salmonella* Albany. Điều này cho thấy nguy cơ tiềm ẩn gen độc tố trên các mẫu thực phẩm nhiễm vi khuẩn gây bệnh đối với người tiêu thụ thực phẩm.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hỗ trợ về kinh phí bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED), mã số 106-NN.04-2015.41.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Alvarez A. M., 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. Annual Review of Phytopathology, 42: 339-366.

Amini K., Salehi T. Z., Nikbakht G., Ranjbar R., Amini J., Ashrafganjooei S. B., 2010. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella* enteritidis isolated from human and animals in Iran. African Journal of Microbiology Research, 4: 2202-2210.

Bäumler A. J., Norris T. L., Lasco T., Voigt W., Reissbrodt R., Rabsch W., Heffron F., 1998. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella* enterica. Journal of bacteriology, 180: 1446-1453.

Bennett A., Greenwood D., Tennant C., Banks J., Betts R., 1998. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. Letters in Applied Microbiology, 26: 437-441.

Chiu C. H., Wu T. L., Su L. H., Chu C., Chia J. H., Kuo A. J., Chien M. S., Lin T. Y., 2002. The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella* enterica serotype Choleraesuis. New England Journal of Medicine, 346: 413-419.

- Das A., Hari S. S., Shalini U., Ganeshkumar A., Karthikeyan M., 2012. Molecular screening of virulence genes from *Salmonella enterica* isolated from commercial food stuffs. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 9: 363-369.
- Groisman E. A., Ochman H., 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends in microbiology*, 5: 343-349.
- Janakiraman A., Slauch J. M., 2000. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology*, 35: 1146-1155.
- Kim J. E., Ju Lee Y., 2017. Molecular characterization of antimicrobial resistant non-typhoidal *Salmonella* from poultry industries in Korea. *Irish Veterinary Journal*, 70: 20.
- Krawiec M., Kuczkowski M., Kruszewicz A. G., Wieliczko A., 2015. Prevalence and genetic characteristics of *Salmonella* in free-living birds in Poland. *BMC veterinary research*, 11: 15.
- Skyberg J. A., Logue C. M., Nolan L. K., 2006. Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. *Avian diseases*, 50: 77-81.
- Smith S. I., Fowora M. A., Atiba A., Anejo-Okopi J., Fingesi T., Adamu M. E., Omonigbehin E. A., Ugo-Ijeh M. I., Bamidele M., Odeigah P., 2015. Molecular detection of some virulence genes in *Salmonella* spp isolated from food samples in Lagos, Nigeria. *Animal and Veterinary Sciences*, 3: 22-27.

THE SURVEY OF EXPRESSION LEVELS OF VIRULENT GENES IN *Salmonella* STRAINS ISOLATED IN RETAIL MEATS IN HA NOI

Nguyen Thi Hoai Thu¹, Nguyen Thanh Viet², Nghiem Ngoc Minh¹, Vo Thi Bich Thuy^{1*}

¹Institute of Genome Research, VAST

¹Hospital 103, Vietnam Military Medical University

SUMMARY

Salmonella is one of the major causes of food poisoning worldwide, especially in developing countries. The virulence of *Salmonella* is a complex process involving between their virulence factors and the host defenses. The purpose of this study was to detect virulent genes and to assess the level of expression of these genes in five *Salmonella* strains (including Enteritidis, Albany, Typhimurium, Hadar, and Derby), which were isolated from meat samples at the retail markets in Hanoi. As a result, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium were 100% positive with seven virulent genes, e.g., *spiA*, *spvB*, *sitC*, *sifA*, *sipB*, *pagC*, and *invA* genes. *Salmonella* Hadar and *Salmonella* Derby positive with six genes, except *spvB*, whereas *Salmonella* Albany was positive with only the *pagC* gene. The comparison of the expression levels of these seven virulent genes and the *16S rRNA* control gene showed a significantly difference among *Salmonella* strains ($P < 0.05$). The result of gene expression of seven virulent genes indicate that *Salmonella* Hadar has the highest gene expression, followed by *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Typhimurium and finally *Salmonella* Albany. The results of molecular biology analysis will provide additional data on the expression of virulent genes in *Salmonella* strains isolated from retail meats in Ha Noi.

Keywords: *Salmonella* spp., RT-PCR, virulence gene

Citation: Nguyen Thi Hoai Thu, Nguyen Thanh Viet, Nghiem Ngoc Minh, Vo Thi Bich Thuy, 2018. The survey of expression levels of virulent genes in *Salmonella* strains isolated in retail meats in Ha Noi. *Tap chi Sinh hoc*, 40(1): 62-68. DOI: 10.15625/0866-7160/v40n1.10633.

*Corresponding author: thuytbvo@igr.ac.vn

Received 7 February 2017, accepted 20 December 2017