

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

NGUYỄN THÀNH TRUNG

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH VÀ PHÂN TÍCH
MỘT SỐ GEN CHỨC NĂNG TRONG *Salmonella*
spp. PHÂN LẬP TỪ THỊT GIA CẦM BẰNG KỸ
THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN THỂ HỆ MỚI**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ VI SINH VẬT HỌC

Mã số: 942 01 07

Hà Nội - 2023

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn khoa học 1: PGS.TS. Phạm Xuân Đà, Đại học Y
Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội
2. Người hướng dẫn khoa học 2: TS. Trần Thị Thanh Huyền, Viện
Nghiên cứu Tế bào gốc và Công nghệ gen Vinmec

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học
viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học
và Công nghệ Việt Nam vào hồi ... giờ ..., ngày ... tháng ... năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Salmonella được Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) liệt kê trong danh sách các mầm bệnh nguy hiểm trong thực phẩm. Nhiễm khuẩn *Salmonella* không chỉ làm giảm năng suất sản xuất, gây chết gia cầm mà còn làm ô nhiễm chuỗi thức ăn của con người, dẫn đến thiệt hại kinh tế nghiêm trọng trong ngành chăn nuôi gia cầm, cũng như là mối đe dọa đối với sức khỏe cộng đồng. Hàng năm, trên thế giới và tại Việt Nam có rất nhiều người chết và một số lượng lớn các trường hợp bị bệnh do nhiễm *Salmonella*. Tuy nhiên, tính đến thời điểm này, nước ta chưa có chương trình giám sát *Salmonella* trên gia cầm ở quy mô quốc gia. Các nghiên cứu chỉ mang tính chất nhỏ lẻ, thực hiện tại các vùng, miền và chưa có tính phản ánh đại diện.

Theo thống kê trước đây, tỉ lệ các trường hợp nhiễm khuẩn *Salmonella* qua đường ăn uống lên tới 95% (Gut et al., 2018). Một phần nguyên nhân là các nhóm sản phẩm thực phẩm có khả năng bị nhiễm khuẩn *Salmonella* rất đa dạng, từ thực phẩm tươi sống tới thực phẩm chế biến, đồ ăn liền, thức ăn đóng hộp, Theo Trung tâm Dự phòng và Kiểm soát bệnh tật Hoa Kỳ (Centers for Disease Control and Prevention – CDC), thịt gia cầm và trứng là nguồn chính bị nhiễm *Salmonella*, chiếm trên 50% số mẫu thực phẩm nhiễm *Salmonella* tại Hoa Kỳ (FDA, 2018). Tính đến thời điểm này, nước ta chưa có chương trình giám sát *Salmonella* trên gia cầm ở quy mô quốc gia. Các nghiên cứu chỉ mang tính chất nhỏ lẻ, thực hiện tại các vùng, miền và chưa có tính phản ánh đại diện. Các dữ liệu giám sát an toàn thực phẩm ở quy mô nhỏ cho thấy 48,7% mẫu gà thu thập được ở nhiều thành phố trên cả nước (Ta et al., 2014) và 49,62% mẫu gà ở thành phố Hồ Chí Minh (Truong et al., 2021) bị nhiễm khuẩn *Salmonella*.

Các nhà khoa học cho đến nay vẫn chưa hiểu hoàn toàn thấu đáo về cơ chế lây truyền của *Salmonella* kháng kháng sinh giữa người, động vật và các yếu tố môi trường. Sự lây nhiễm của *Salmonella* kháng kháng sinh

giữa con người, động vật hay môi trường được nghiên cứu trong nhiều công trình từ trước đây sử dụng các phương pháp sinh học phân tử như điện di xung trường đẩy (pulsed-field gel electrophoresis - PFGE) (Scaltriti et al., 2015) hay multi-locus sequence typing (MLST) (Achtman et al., 2012). Tuy nhiên, các phương pháp trên vẫn tồn tại những hạn chế về khả năng phân biệt các khuẩn lạc hay các chủng *Salmonella* có quan hệ gần gũi, đặc biệt trong các trường hợp điều tra ngộ độc hay phân biệt các serovar có nguồn gốc gần nhau. Nhằm khắc phục điểm yếu đó, một phương pháp nghiên cứu hiện đại và ưu việt hơn hẳn là giải trình tự hệ gen (whole genome sequencing – WGS) được đưa vào sử dụng trong các nghiên cứu dịch tễ học phân tử của các vi sinh vật gây bệnh mang gen kháng kháng sinh (Gilchrist et al., 2015). Một nghiên cứu ứng dụng WGS tại Đan Mạch báo cáo kết quả sử dụng các phương pháp single nucleotide polymorphisms (SNP), pangenome, k-mer và cây phát sinh loài cho hiệu quả cao hơn trong việc phân loại chủng và đánh giá tương quan giữa các chủng phân lập được ở các vụ ngộ độc thực phẩm gây ra do *S. Typhimurium* (Leekitcharoenphon et al., 2014). Ở Việt Nam, việc ứng dụng WGS cho các nghiên cứu chuyên sâu nhằm phân tuýp huyết thanh và phân tích chức năng các gen liên quan đến kháng kháng sinh, gen độc lực, sự tồn tại các plasmid và các đảo SPI của các chủng vi sinh gây bệnh, đặc biệt là các nghiên cứu đánh giá về *Salmonella* trong nước còn chưa phổ biến (Gonzalez-Santamarina et al., 2020). Xuất phát từ những luận giải trên, luận án được thực hiện với tên đề tài “*Nghiên cứu xác định và phân tích một số gen chức năng trong Salmonella spp. phân lập từ thịt gia cầm bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới*” đã được thực hiện với mục tiêu và nội dung nghiên cứu cụ thể như sau:

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Đánh giá tỉ lệ nhiễm, mức độ kháng kháng sinh, kháng chất tẩy rửa của *Salmonella* spp. phân lập từ thịt gia cầm (gà, vịt và ngan) thu thập tại thành phố Hà Nội;

Phân tích, đánh giá các gen liên quan đến tính kháng kháng sinh, yếu tố di truyền vận động, yếu tố gây độc của các chủng *Salmonella* spp.

3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

1. Xác định tỉ lệ nhiễm *Salmonella* spp. trong thịt gia cầm (gà, vịt và ngan) thu thập tại các chợ ở thành phố Hà Nội năm 2019;

2. Đánh giá mức độ kháng kháng sinh, kháng chất tẩy rửa của các chủng *Salmonella* spp. được phân lập từ thịt gia cầm (gà, vịt và ngan);

3. Xác định các gen kháng kháng sinh, yếu tố gây độc, sự tồn tại các plasmid của một số chủng *Salmonella* spp. đa kháng kháng sinh nhờ kỹ thuật phân tích hệ gen.

4. Những đóng góp mới của luận án

- Xác định được tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. liên quan đến sự có mặt của các gen kháng kháng sinh, kháng chất tẩy rửa của các chủng *Salmonella* phân lập được từ mẫu thịt vịt và ngan tại thành phố Hà Nội năm 2019.

- Xác định được yếu tố di truyền vận động IVSs3, ISEc57, ISEc59, IS102, IS26 mang gen kháng kháng sinh *floR*, *qnrS1*, *bla_{CTX-M-55}*, *bla_{CTX-M65}*, *aac (3)*, *aac (4)*

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

5.1. Ý nghĩa khoa học

- Cung cấp được dữ liệu khoa học về tỉ lệ nhiễm *Salmonella* spp. trên từng đối tượng gia cầm: gà, vịt và ngan tại thành phố Hà Nội năm 2019;

- Cung cấp đặc điểm kháng kháng sinh về kiểu hình và kiểu gen các chủng *Salmonella* spp. phân lập từ gia cầm (gà, vịt và ngan) tại thành phố Hà Nội;

- Cung cấp dữ liệu về khả năng kháng với chất tẩy rửa có hoạt tính hoạt động bề mặt;

- Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu về đánh giá nguy cơ các chủng *Salmonella* spp. trong gia cầm nói riêng và các vi khuẩn truyền qua thực phẩm nói chung.

5.2. Ý nghĩa thực tiễn

- Luận án đã đánh giá được tỉ lệ nhiễm *Salmonella* spp. trên gà, vịt và ngan nguyên con tại thành phố Hà Nội và mức độ kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp. lưu hành trong gia cầm về cả kiểu hình và kiểu gen.

- Hơn nữa, kết quả của nghiên cứu giúp hiểu rõ hơn về việc kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp. để từ đó góp phần nâng cao nhận thức, cách thức sử dụng kháng sinh và chất tẩy rửa trong chăn nuôi gia cầm, đồng thời hỗ trợ tích cực công tác đảm bảo an toàn thực phẩm nói chung.

6. Cấu trúc của Luận án

Luận án bao gồm 184 trang, trong đó phần mở đầu 4 trang, tổng quan 28 trang, vật liệu và phương pháp 20 trang, kết quả và thảo luận 67 trang, kết luận và kiến nghị 1 trang, các công bố 1 trang, tài liệu tham khảo 25 trang. Luận án có 11 bảng và 14 hình (không bao gồm phụ lục).

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Đặc điểm sinh học của *Salmonella*

1.1.1. Một số đặc điểm chung của *Salmonella*

1.1.2. Đặc điểm hình thái

1.1.3. Tính chất nuôi cấy

1.1.4. Sức đề kháng của *Salmonella*

1.1.5. Phân loại của *Salmonella*

1.1.6. Khả năng gây bệnh của *Salmonella*

1.1.7. Cấu trúc hệ gen của *Salmonella*

1.2. Tình hình nhiễm, kháng kháng sinh, kháng chất tẩy rửa ở *Salmonella*

1.2.1. Tình hình nhiễm và kháng kháng sinh trên thế giới

1.2.2. Tình hình nhiễm và kháng kháng sinh tại Việt Nam

1.2.3. Tình hình kháng chất tẩy rửa ở *Salmonella*

1.3. Cơ chế kháng và các họ gen liên quan đến tính kháng ở *Salmonella*

1.3.1 Cơ chế kháng kháng sinh ở *Salmonella* và họ kháng sinh *Betalactam*

1.3.2. Gen độc lực, đảo *SPI* ở *Salmonella*

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm, thời gian nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng

- 182 mẫu thịt gà, vịt và ngan nguyên con được thu thập tại chợ tại Hà Nội.

2.1.2. Địa điểm

- Địa điểm lấy mẫu: 70 chợ trên địa bàn 05 quận tại thành phố Hà Nội.

- Địa điểm tiến hành nghiên cứu: Khoa Vi sinh vật (được đổi tên là Khoa vi sinh và Biến đổi gen từ ngày 01 tháng 01 năm 2020 - nay) của Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia, Bộ Y tế.

2.1.3. Thời gian thực hiện

- Từ tháng 4 năm 2019 đến tháng 6 năm 2022:

- Thời điểm lấy mẫu gia cầm (gà, vịt và ngan): tháng 9 đến tháng 10 năm 2019.

2.2. Môi trường, hóa chất, dụng cụ thí nghiệm

2.2.1. *Môi trường nuôi cấy, hóa chất*

2.2.2. *Chủng chuẩn*

2.2.3. *Kháng huyết thanh Salmonella.*

2.2.4. *Kháng sinh*

2.2.5. *Dụng cụ, trang thiết bị máy móc phòng thí nghiệm.*

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. *Phương pháp lấy mẫu*

Lấy mẫu: thực hiện nghiên cứu cắt ngang; mẫu được lấy ngẫu nhiên.

2.3.2. *Phương pháp phân lập và kháng định Salmonella spp.*

Mẫu được thực hiện kiểm nghiệm sự tồn tại (phát hiện) sự có mặt của *Salmonella* spp. theo quy trình USDA method (MLG 4.04) (Laboratory Guidebook Notice of Change Title: Isolation and Identification of Salmonella from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges, n.d.) mục 4.5.5 (Whole Bird and Parts Rinses).

2.3.3. *Kỹ thuật MALDI – TOF định danh vi sinh vật*

2.3.4. *Phương pháp xác định khả năng miễn cảm với kháng sinh*

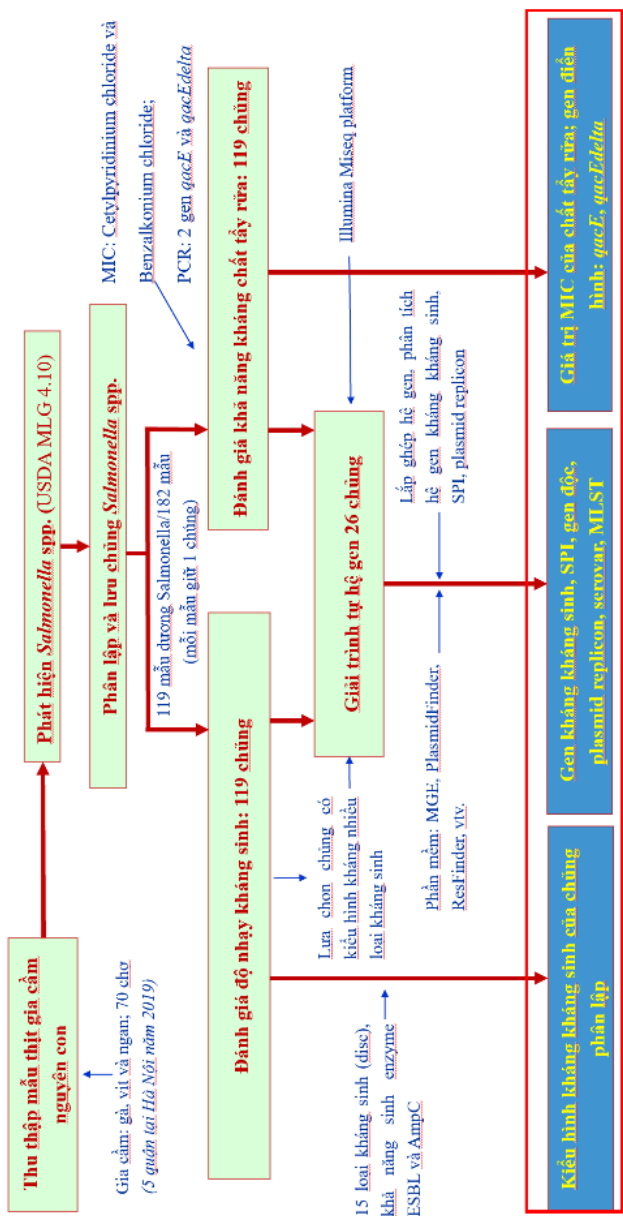
2.3.5. *Xác định Salmonella sinh enzym β -lactamase*

2.3.6. *Giải trình tự bộ gen của các chủng Salmonella đã được phân lập*

2.3.7. *Phân tích kết quả giải trình tự bộ gen các chủng Salmonella*

2.3.8. *Phương pháp xác định MIC và gen qac của chất tẩy rửa*

Sơ đồ nghiên cứu tổng quát trong Luận án



CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định tỉ lệ nhiễm *Salmonella* spp. trong thịt gia cầm (gà, vịt và ngan) thu thập tại các cửa hàng, siêu thị ở Hà Nội.

Tổng số mẫu nghiên cứu là 182 mẫu, gồm thịt gà, vịt và ngan nguyên con được thu thập tại các chợ trên địa bàn các 05 quận tại Hà Nội.

Toàn bộ 182 mẫu được kiểm nghiệm theo phương pháp USDA MLG 4.10, đồng thời thử khẳng định mẫu dương bằng kỹ thuật Maldi TOF (mỗi mẫu dương thử khẳng định một khuẩn lạc bằng Maldi TOF). Các khuẩn lạc sau khi được khẳng định được đánh mã, lưu tại điều kiện -80 °C cho các nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả 119 mẫu dương tính với *Salmonella* theo phương pháp USDA MLG 4.10: kết quả hóa sinh điển hình các tính chất của *Salmonella*: TSI sinh axit từ glucose (+); TSI sinh khí từ glucose (+); TSI sinh axit từ lactose (-); TSI sinh axit từ sucrose (-); TSI tạo hydro sulfid (+); Thủy phân ure (-); Lyzin đã khử nhóm cacboxyl (+); Phản ứng β -galactosidase (-); Sinh indol (-); và kết quả thử nghiệm kháng huyết thanh O đa giá và H đa giá: ngưng kết kháng huyết thanh. Mỗi mẫu dương tính *Salmonella* (119 mẫu dương tính) chọn một khuẩn lạc *Salmonella* đã thử nghiệm hóa sinh/kháng huyết thanh chạy trên máy Maldi TOF. Kết quả trên máy Maldi TOF cho thấy 100% các chủng phân lập được là *Salmonella enterica*. Các chủng phân lập được lưu ở điều kiện -80 °C cho các thí nghiệm về kháng kháng sinh, kháng chất tẩy rửa và giải trình tự hệ gen. Tỉ lệ mẫu dương tính theo quận được thể hiện tại Bảng 3.1 cho thấy hầu hết số quận đều có tỉ lệ nhiễm cao hơn 55%, điều đó cho thấy trên 50% số gia cầm chúng ta ăn là nhiễm *Salmonella* spp. Đặc biệt, quận Hoàng Mai và quận Thanh Xuân tỉ lệ nhiễm khoảng 70%. Mặc dù, gia cầm thường được chế biến chín để sử dụng nhưng với một tỉ lệ nhiễm cao như vậy sẽ dễ gây lây lan sang các thực phẩm khác và khả năng gây ngộ độc rất đáng lo ngại.

Bảng 3.1. Kết quả phân tích Salmonella trong thịt gà, vịt và ngan theo quận tại thành phố Hà Nội năm 2019

Tên Quận	Số mẫu dương	Tổng số mẫu	Tỉ lệ dương tính
Ba Đình	19	33	57,58%
Cầu Giấy	24	37	64,86%
Hoàng Mai	26	37	70,27%
Thanh Xuân	27	39	69,23%
Đống Đa	23	36	63,89%
Tổng	119	182	65,38%

Kết quả thấy tỉ lệ dương tính trên thịt gà, thịt vịt và ngan lần lượt là 62,50%; 72,34%; 64,52% và tỉ lệ dương tính trên cả ba loại gia cầm là 65,38%.

3.2. Đánh giá mức độ kháng các kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp. được phân lập từ thịt gia cầm

Đánh giá khả năng kháng kháng sinh của 119 chủng *Salmonella* được phân lập từ các mẫu dương tính.

*3.2.1. Sự nhạy cảm kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* phân lập từ gà*

Sự nhạy cảm kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* phân lập từ gà được thể hiện trong Bảng 3.2. Trong số 65 chủng *Salmonella* được phân lập từ gà có 63/65 chủng (96,9%) đã đề kháng với ít nhất một trong số 15 loại kháng sinh. Tất cả các chủng đều nhạy cảm với cefoxitin, meropenem và imipenem. Tổng cộng, 93,85% số chủng (61/65) là chủng đa kháng thuốc (kháng với ít nhất 3 họ kháng sinh).

*3.2.2. Sự nhạy cảm kháng sinh của các chủng *Salmonella* phân lập từ vịt*

Sự nhạy cảm kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* phân lập từ vịt được thể hiện trong Bảng 3.2. Trong số 34 chủng *Salmonella* được phân lập có 32/34 chủng (94,12%) đã đề kháng với ít nhất một trong số 15 loại kháng sinh. Tất cả các chủng *Salmonella* phân lập được đều nhạy cảm với cefoxitin, meropenem và imipenem. Tổng cộng, 82,35% số chủng phân lập từ vịt (28/34) là chủng đa kháng thuốc (kháng với ít nhất 3 họ kháng sinh).

3.2.3. Sự nhạy cảm kháng sinh của các chủng *Salmonella* phân lập từ ngan

Sự nhạy cảm kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* phân lập từ ngan được thể hiện trong Bảng 3.2. Tất cả các chủng *Salmonella* phân lập được đều nhạy cảm với cefoxitin, meropenem và imipenem. Tổng cộng, 95,00% số chủng (19/20) là chủng đa kháng thuốc (kháng với ít nhất 3 họ kháng sinh).

3.2.4. Kiểu hình kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* phân lập từ thịt gà, vịt và ngan

Khả năng kháng kháng sinh của tất cả các chủng *Salmonella* phân lập từ mẫu thịt gà, vịt và ngan được thể hiện trong Bảng 3.2. Trong tổng số 119 chủng *Salmonella* được phân lập có 118/119 chủng (99,16%) đã đề kháng với ít nhất một trong số 15 loại kháng sinh. Kết quả thử nghiệm tính nhạy cảm kháng sinh cho thấy kiểu hình kháng cao nhất với ampicillin (89,08%; 106/119), cefazolin (88,24%; 105/119), tetracycline (87,39%; 104/119); tiếp theo là cefuroxime và cefotaxime (79,83%; 95/119); ceftriaxone (78,99%; 94/119), chloramphenicol (77,31%; 92/119), trimethoprim (68,07%; 81/119), nalidixic acid (66,39%; 79/119), gentamycin (57,98%; 69/119), ceftazidime (47,06%, 56/119), cuối cùng là ciprofloxacin (5,88%; 7/119). Tất cả các chủng *Salmonella* phân lập được từ mẫu thịt gia cầm đều nhạy cảm với cefoxitin và meropenem, imipenem. Tổng cộng, 90,76% số chủng (108/119) là chủng đa kháng thuốc (kháng với ít nhất 3 họ kháng sinh). Về khả năng sinh enzyme β -lactamase, 94/119

(78,99%) chủng đã phân lập sinh enzyme ESBL và 87/119 (73,11%) chủng sinh enzyme AmpC.

Sự khác biệt không lớn về sự kháng kháng sinh giữa các chủng *Salmonella* được phân lập từ gà, vịt và ngan được giải thích do điều kiện nuôi và giết mổ của chúng là tương đồng. Tại Việt Nam, gà, vịt và ngan thường được nuôi cùng nhau, do vậy chúng sẽ cùng tiếp xúc với các điều kiện tự nhiên, thức ăn, nơi sống cùng hoặc rất gần nhau và và điều kiện nơi giết mổ cũng khá tương đồng nhau. Điều này giải thích cho việc chúng sẽ cùng kháng hoặc nhạy cảm với các kháng sinh tương tự nhau.

Bảng 3.2. Bảng kết quả độ nhạy kháng sinh

Kháng sinh		Mẫu gia cầm gồm: gà, vịt và ngan		Mẫu Gà		Mẫu Vịt		Mẫu Ngan	
		Số chủng	Tỉ lệ %	Số chủng	Tỉ lệ %	Số chủng	Tỉ lệ %	Số chủng	Tỉ lệ %
cefazolin (CZ)	S	2	1,68	1	1,54	1	2,94	0	0,00
	I	12	10,08	4	6,15	5	14,71	3	15,00
	R	105	88,24	60	92,31	28	82,35	17	85,00
cefoxitin (FOX)	S	117	98,32	64	98,46	33	97,06	20	100,00
	I	2	1,68	1	1,54	1	2,94	0	0,00
	R	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
cefuroxime (CXM)	S	23	19,33	9	13,85	11	32,35	3	15,00
	I	1	0,84	1	1,54	0	0,00	0	0,00
	R	95	79,83	55	84,62	23	67,65	17	85,00
ceftriaxone (CRO)	S	23	19,33	10	15,38	10	29,41	3	15,00
	I	2	1,68	1	1,54	1	2,94	0	0,00
	R	94	78,99	54	83,08	23	67,65	17	85,00
ceftazidime (CAZ)	S	44	36,97	20	30,77	15	44,12	9	45,00
	I	19	15,97	13	20,00	5	14,71	1	5,00
	R	56	47,06	32	49,23	14	41,18	10	50,00

cefotaxime (CTX)	S	23	19,33	9	13,85	11	32,35	3	15,00
	I	1	0,84	1	1,54	0	0,00	0	0,00
	R	95	79,83	55	84,62	23	67,65	17	85,00
ciprofloxacin (CIP)	S	101	84,87	60	92,31	25	73,53	16	80,00
	I	11	9,24	3	4,62	6	17,65	2	10,00
	R	7	5,88	2	3,08	3	8,82	2	10,00
trimethoprim (TM)	S	38	31,93	24	36,92	8	23,53	6	30,00
	I	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	R	81	68,07	41	63,08	26	76,47	14	70,00
gentamycin (CN)	S	33	27,73	15	23,08	11	32,35	7	35,00
	I	17	14,29	16	24,62	0	0,00	1	5,00
	R	69	57,98	34	52,31	23	67,65	12	60,00
tetracycline (TE)	S	5	4,20	2	3,08	2	5,88	1	5,00
	I	10	8,40	5	7,69	4	11,76	1	5,00
	R	104	87,39	58	89,23	28	82,35	18	90,00
chloramphenicol (C)	S	27	22,69	9	13,85	9	26,47	9	45,00
	I	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	R	92	77,31	56	86,15	25	73,53	11	55,00
ampicillin (AMP)	S	13	10,92	5	7,69	7	20,59	1	5,00
	I	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

	R	106	89,08	60	92,31	27	79,41	19	95,00
meropenem (MRP)	S	119	100,00	65	100,00	34	100,00	20	100,00
	I	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	R	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
nalidixic acid (NA)	S	17	14,29	7	10,77	7	20,59	3	15,00
	I	23	19,33	8	12,31	9	26,47	6	30,00
	R	79	66,39	50	76,92	18	52,94	11	55,00
imipenen (IMI)	S	119	100,00	65	100	34	100,00	20	100,00
	I	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0,00
	R	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0,00
Chủng sinh ESBL		94	78,99	54	83,08	23	67,65	17	85,00
Chủng sinh AmpC		87	73,11	54	83,08	18	52,94	15	75,00
Kháng đa kháng sinh		108	90,76	61	93,85	28	82,35	19	95,00

Chú thích: Cefazolin (CZ), ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), ciprofloxacin (CIP), trimethoprim (TMP), gentamicin (CN), tetracycline (TE), chloramphenicol (C), ampicillin (AMP), meropenem (MRP), imipenen (IMI), nalidixic acid (NA), Extended spectrum Beta-lactam (ESBL), AmpC β -lactamase (AmpC), Multi Drug Resistance (MDR)

3.3. Đánh giá khả năng kháng chất tẩy rửa của một số chủng *Salmonella* spp. đa kháng kháng sinh

Đánh giá 119 chủng *Salmonella* được phân lập từ các mẫu dương về khả năng kháng chất tẩy rửa nhằm đánh giá mức độ lây lan và sự phức tạp sự nhiễm *Salmonella* trong sản xuất nông nghiệp, đặc biệt là trong chăn nuôi gia cầm và giết mổ gia cầm: xác định sự tồn tại của hai gen *qacE*, *qacEdelta* và xác định giá trị MIC của chất sát khuẩn QAC.

Đánh giá khả năng kháng với 02 chất QAC: Benzalkonium chloride (BKC) và Cetylpyridinium chloride (CPCP) tại các nồng độ khác nhau, kết quả được tổng hợp trong Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Kết quả tổng hợp xác định kháng chất hoạt động bề mặt

Nội dung	<i>qacE</i>	<i>qacEdelta</i>
Giá trị MIC trung bình với BKC các chủng mang gen	20,5	20,5
Giá trị MIC trung bình với CPC các chủng mang gen	10,5	10,6
Giá trị MIC kháng trung bình với BKC các chủng không mang gen	16,3	16,5
Giá trị MIC kháng trung bình với CPC các chủng không mang gen	7,2	7,2
Số chủng mang gen	73	72
Tỉ lệ chủng mang gen	61,34%	60,54%
Số chủng mang cả 2 gen <i>qacE</i> và <i>qacEdelta</i>	71 (59,66%)	

Kết quả 71/119 chủng mang cả 2 gen *qacE* và *qacEdelta*, giá trị kháng trung bình của các chủng mang *qacE* với BKC, CPC lần lượt là 20,5 và 10,5 ppm; trong khi đó giá trị MIC với BKC, CPC các chủng không mang gen *qacE* là 16,3 và 7,2 ppm; tương tự với gen *qacEdelta*.

3.4. Kết quả phân tích gen kháng kháng sinh từ một số chủng *Salmonella* phân lập

Từ kết quả kiểu hình về sự kháng kháng sinh, kháng chất tẩy rửa lựa chọn 26 chủng có kiểu hình kháng mạnh và kháng yếu để phân tích toàn bộ hệ gen.

3.4.1. Đặc điểm hệ gen Salmonella

Kết quả chạy máy giải trình tự đáp ứng về chất lượng, cho phép thực hiện các phân tích tiếp theo.

3.4.2. Kết quả xác định tuýp huyết thanh và MLST

Sử dụng đồng thời 02 phần mềm cho kết quả không có sự khác biệt, kết quả các serovar thu được của 26 chủng *Salmonella* phân lập được trình bày ở bảng sau (Bảng 3.4.)

3.4.3. Kết quả gen kháng kháng sinh

Sử dụng phần tìm kiếm gen kháng kháng sinh (*Salmonella In Silico*), các chủng giải trình tự có tổng cộng 82 gen kháng kháng sinh khác nhau và những gen này thuộc các họ gen khác nhau. Dự đoán kiểu gen kháng kháng sinh hoàn toàn khớp với kết quả kiểu hình đã ghi nhận trong nghiên cứu này.

Các gen liên quan tới kháng kháng sinh beta-lactam được xác định có mặt trong hệ gen của toàn bộ 26 chủng *Salmonella* trong nghiên cứu. Gen *bla*_{CTX-M-55_1} có trong 15 chủng, chiếm 57,69%; gen *bla*_{CTX-M-65_1} có ở 5 chủng (19,23%); gen *bla*_{CTX-M-14b_1} và gen *bla*_{CTX-M-9} cùng xuất hiện trong 2 chủng (7,69%). Tuy nhiên hai gen *bla*_{CTX-M-55_1}, *bla*_{CTX-M-65_1} và nhóm gen *bla*_{CTX-M-14b_1}, *bla*_{CTX-M-9} không xuất hiện cùng nhau trong bất kỳ chủng nào. Khả năng kháng lại các loại kháng sinh khác nhau, bao gồm amoxicillin, ampicillin, aztreonam, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, piperacillin và ticarcillin, cũng được dự đoán do nhóm gen này. Thêm vào

đó, 6/26 chủng (23,08%) mang gen *ampH*, gen này có khả năng kháng kháng sinh họ beta-lactam dù không sinh ESBL.

Một trong phát hiện đặc biệt của nghiên cứu là một số gen qui định tính kháng Lóp kháng sinh Beta-lactam nằm trên các yếu tố di truyền vận động: *bla*_{CTX-M-65} nằm trên yếu tố di truyền IS102 trên các mẫu từ gà, vịt và ngan (mẫu 21, 25, 64 và 109) và gen *bla*_{CTX-M-55} nằm trên yếu tố di truyền ISKPN19 cùng với *qnrS1*; mẫu 55 có yếu tố di truyền vận động IS6100 mang gen *mph(A)*.

Sự quan trọng của kết quả nghiên cứu được thấy rõ trong báo cáo về gen kháng kháng sinh, 26 chủng được giải trình tự mang 82 gen kháng kháng sinh. Tất cả các chủng đều mang nhiều loại gen kháng kháng sinh nhóm aminoglycoside (*aac (3) -Iia*, *aac (3) -IId_1*, *aac (6) -Iaa_1* ...), hơn nữa chủng số 68 mang gen *rmtB* mã hóa enzym 16S RNA methyltransferase, có khả năng kháng lại tất cả các nhóm kháng sinh aminoglycoside, là nhóm kháng sinh cực kỳ quan trọng trong chăn nuôi và điều trị bệnh ở người. Hơn nữa, 24/26 chủng có kiểu hình sinh enzym ESBL đều mang gen *bla*_{CTX-M-55} (7 Munster serovar và 1 Kentucky), điều khá ngạc nhiên là chủng 68 với 05 gen kháng kháng sinh họ beta-lactam trên 1 contig (*bla*_{TEM-1B}; *bla*_{CTX-M-55}; *bla*_{TEM-206}; *bla*_{TEM-214} và *bla*_{TEM-141}) và mẫu 51 bao gồm 11 gen liên quan đến kháng kháng sinh β -lactam, đặc biệt 10/11 gen nằm trên một contig (*bla*_{LAP-2}; *bla*_{TEM-214}; *bla*_{TEM-206}; *bla*_{TEM-33}; *bla*_{TEM-1B}; *bla*_{TEM-216}; *bla*_{TEM-209}; *bla*_{CTX-M-55}; *bla*_{TEM-34}; *bla*_{TEM-210}; *bla*_{TEM-141}), đây là kết quả được báo cáo đầu tiên của cụm gen này ở Việt Nam.

Bảng 3.4. Bảng phân bố tuýp huyết thanh và MLST của Salmonella spp.

Mẫu	Gia cầm	Serovar	Serogroup	H1	H2	O Antigen	MLST
8_S1	Gà	Agona	B	f,g,s	-	1,4,[5],12	13
12_S2	Gà	Typhimurium	-	l,v	1,6	3,{10}{15}	155
13_S3	Gà	Newport	C2-C3	e,h	1,2	6,8,20	4157
19_S4	Gà	Corvallis	C2-C3	z4,z23	-	8,2	1541
21_S5	Gà	Infantis	-	r	1,5	6,7,14	32
25_S6	Gà	Infantis	-	r	1,5	6,7,14	32
52_S14	Gà	Meleagridis	-	e,h	l,w	3,{10}{15} {15,34}	463
56_S15	Gà	Muenster	-	e,h	1,5	3,{10}{15} {15,34}	321
61_S18	Gà	Typhimurium	-	l,v	1,6	3,{10}{15}	155
64_S19	Gà	Infantis	-	r	1,5	6,7,14	32
32_S8	Ngan	Muenster	-	e,h	1,5	3,{10}{15} {15,34}	321
37_S9	Ngan	Infantis	-	r	1,5	6,7,14	32

74_S1	Ngan	Kentucky	C2-C3	i	z6		198
89_S1	Ngan	Agona	-	f,g,s	-		13
109_S2	Ngan	Infantis	C1	r	1,5		32
129_S3	Ngan	Newport	C2-C3	e,h	1,2		4157
146_S4	Ngan	Agona	B	f,g,s	-		13
148_S5	Ngan	Muenster	E1	e,h	1,5		321
68_S20	Vit	Kentucky	C2-C3	i	z6	8,2	198
43_S11	Vit	Muenster	-	e,h	1,5	3,{10}{15} {15,34}	321
45_S12	Vit	Muenster	-	e,h	1,5	3,{10}{15} {15,34}	321
51_S13	Vit	Muenster	E1	e,h	1,5	3,{10}{15} {15,34}	321
31_S7	Vit	Muenster	-	e,h	1,5	3,{10}{15} {15,34}	321
42_S10	Vit	Muenster	-	e,h	1,5	3,{10}{15} {15,34}	321
57_S16	Vit	Muenster	-	e,h	1,5	3,{10}{15} {15,34}	321
60_S17	Vit	Muenster	-	e,h	1,5	3,{10}{15} {15,34}	321

3.4.4. Nhóm gen liên kết

Nhiều cụm gen kháng kháng sinh được tìm thấy trong 26 chủng *Salmonella* được giải trình tự hệ gen. Sử dụng công cụ tìm kiếm Mobile element Finder đã xác định được 50 cụm gen liên kết, mỗi cụm gen có từ 2 đến 10 gen kháng kháng sinh, thậm chí một số cụm gen mang cả các gen kháng chất tẩy rửa như *qacE* hoặc *qacEdelta*. Một cụm gen ở chủng số S051 chứa contig00317 gồm 10 gen liên quan đến khả năng kháng kháng sinh, thậm chí chúng mang các gen liên quan đến tính kháng kháng sinh của họ cephalosporin từ thế hệ 1 đến thế hệ 3 và 4.

3.5. Kết quả phân tích hệ gen về plasmid replicon, gen độc và các SPI

Kết quả về yếu tố gây độc tìm thấy trong các mẫu: rất đa dạng và nhiều gen gây bệnh tham gia vào quá trình gây bệnh của *Salmonella* trên động vật và người được thể hiện trong Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Sự phân bố Plasmid replicon, SPI và VFs

Chủng	Serovar	Plasmid replicon	Số lượng VFS	Số lượng gen	SPI
12_S2	Typhimurium	IncA/C2 ColRNAI	23	82	CS54, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-9, SPI-13
13_S3	Newport	Col156 IncHI2 IncHI2A	26	90	C63PI, S54, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9, SPI-13
19_S4	Corvallis	IncHI2 Col156 IncHI2A	21	83	SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9
21_S5	Infantis	IncF	29	101	SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-9, SPI-13

25_S6	Infantis		30	93	C63PI, S54, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9, SPI-13, SPI-14
52_S14	Meleagridis	IncFIB Col(MGD2)	24	80	C63PI, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9
56_S15	Muenster		22	82	SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-9, SPI-13, SPI-14
61_S18	Typhimurium	IncA/C2 ColRNAI	21	78	SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-13, SPI-14
64_S19	Infantis		29	93	C63PI, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-9, SPI-13, SPI-14
8_S1	Agona	IncL/M IncX1_1	81	21	C63PI, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9
68_S20	Kentucky		23	83	SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-9
43_S11	Muenster	IncHI2_1 IncHI2A_1	20	75	SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-9, SPI-13, SPI-14
45_S12	Muenster		21	79	SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-13, SPI-14
51_S13	Muenster		23	84	C63PI, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9, SPI-13

31_S7	Muenster		24	82	SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9, SPI-13, SPI-14
42_S10	Muenster		23	79	C63PI, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9, SPI-13, SPI-14
57_S16	Muenster		23	81	C63PI, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-13
60_S17	Muenster	IncL/M(pM U407)_1_pM U407	21	72	SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-13, SPI-14
32_S8	Infantis		21	80	SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-9, SPI-13
37_S9	Muenster		29	96	CS54-island, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9, SPI-13
74_S1	Kentucky	ColRNAI_1	28	95	C63PI, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-9
89_S1	Agona	ColRNAI_1	28	102	C63PI, SG11, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-9
109_S2	Infantis	IncFIB(K)_1 _Kpn3	31	100	C63PI, CS54- island, SG11, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-9, SPI-13, SPI-14

129_S3	Newport	IncHI2A_1 IncHI2_1 RepA_1_pK PC- CAV1321	28	94	C63PI, CS54- island, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-9, SPI-13, SPI-14
146_S4	Agona	IncI_Gamma _1 IncFII(pHN7 A8) 1_pHN7A8 p0111_1	27	99	C63PI, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-9
148_S5	Muenster		27	98	C63PI, SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-9

Nghiên cứu cũng phát hiện sự đa dạng, phong phú các plasmid replicon, SPI được tìm thấy. Một số các plasmid mang các gen kháng kháng sinh được xác định. Một kết quả được tìm thấy khi phân tích hệ gen là các gen mã hóa cho các độc tố: *fyuA*, *ipr2*, *traT*, *astA*, *terC*. Điều này giải thích cho khả năng gây bệnh cũng như gây ngộ độc thực phẩm của *Salmonella*.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã xác định được tỉ lệ nhiễm *Salmonella* spp. trong thịt gia cầm (gà, vịt và ngan) thu thập tại các chợ ở thành phố Hà Nội là: 65,38% mẫu nhiễm *Salmonella* spp. (119/182 mẫu); tỉ lệ nhiễm *Salmonella* spp. từng nhóm gia cầm: gà 62,50% (65/104); vịt 72,34% (34/47) và ngan 64,52% (20/31).

2. Đã đánh giá được mức độ kháng các kháng sinh và kháng chất tẩy rửa của các chủng *Salmonella* spp. được phân lập từ thịt gia cầm:

ampicillin (89,08%), cefazolin (88,24%), tetracycline (87,39%); cefuroxime và cefotaxime (79,83%); ceftriaxone (78,99%), chloramphenicol (77,31%), trimethoprim (68,07%), nalidixic acid (66,39%), gentamycin (57,98%), ceftazidime (47,06%) và ciprofloxacin (5,88%); đồng thời xác định được mối liên quan các chủng *Salmonella* mang gen *qacE* và *qacDelta* với khả năng kháng hai chất tẩy rửa Benzalkonium chloride và Cetylpyridinium chloride.

3. Đã xác định được các gen chức năng liên quan đến tính kháng kháng sinh của một số chủng *Salmonella* spp. nhờ kỹ thuật phân tích hệ gen gồm: 82 liên quan đến nhiều loại kháng sinh khác nhau; một số gen liên quan tính kháng kháng sinh thế hệ 3 và 4 thuộc họ cephalosporin (Beta-lactam) như gen *bla*_{CTX-M-55_1} có trong 15 chủng (57,69%); gen *bla*_{CTX-M-65_1} có ở 5 chủng (19,23%); gen *bla*_{CTX-M-14b_1} và gen *bla*_{CTX-M-9} (7,69%, 2/26) và gen *bla*_{TEM-33}, *bla*_{TEM-34}; gen *mcr-3* liên quan đến tính kháng colistin; gen *mrtB* kháng với toàn bộ các kháng sinh thuộc lớp Amiloglycosides; một số **yếu** tố di truyền vận động (IVSs3, ISEc57,...) mang các gen kháng kháng sinh quan trọng như *floR*, *qnrS1*, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M65}, *aac (3)*, *aac (4)*; và phát hiện sự tồn tại các đơn vị sao chép của plasmid là IncA/C, IncHI2, IncL/M, ColRNAI, Col156, IncHI2A, IncF, IncFIB, IncFIB, IncI; sự lưu hành phong phú của SPI và gen độc lực trong các chủng phân lập.

KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu sự ảnh hưởng các đột biến đến sự kháng kháng sinh trong các chủng *Salmonella* phân lập tại Việt Nam từ gia cầm.

Nghiên cứu về sự biểu hiện tính độc của các gen độc được tìm thấy như *fyuA*, *ipr2*, *traT*, *astA* và *terC*.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Trung Thanh Nguyen**, Hoa Vinh Le, Yen Thi Ta, Da Xuan Pham, Nam Trung Nguyen (2022). Prevalence and Whole-Genome Analysis of Multidrug-Resistant *Salmonella* Isolated from Chicken Carcasses in Hanoi. *Vietnam Journal of Biotechnology* 20 (4):705-15; <https://doi.org/10.15625/1811-4989/17495>.
2. **Trung Thanh Nguyen**, Hoa Vinh Le, Yen Thi Ta, Da Pham Xuan, Nam Trung Nguyen, Nguyen Huy Hoang (2022). Characteristic of Multiple-Antibiotic-Resistant *Salmonella enteritica* from Muscovy Duck in Hanoi. *Academia Journal of Biology* 44 (4):1-17; <https://doi.org/10.15625/2615-9023/17499>.
3. **Trung Thanh Nguyen**, Hoa Vinh Le, Da Pham Xuan, Trung Nghia Vu, Minh Hong Nguyen, Huyen Thi Thanh Tran (2022). Whole-Genome Sequencing of Antimicrobial-Resistance *Salmonella enterica* Isolates from Cairina Moschata Carcass in Vietnam. *Data in Brief*, Volume 47, 2023, 108932, ISSN 2352-3409; <https://doi.org/10.1016/j.dib.2023.108932>
4. **Trung Thanh Nguyen**, Hoa Vinh Le, Ha Vu Thi Hai, Thanh Nguyen Tuan, Huong Minh Nguyen, Da Pham Xuan, Huyen Tran Thi Thanh, Hao Hong Le Thi (2022). Whole Genome Analysis of Antimicrobial Resistant *Salmonella enteritica* Isolated from Duck Carcasses in Hanoi, Vietnam. *Current Issues in Molecular Biology*, 2023, 45(3), 2213-2229; <https://doi.org/10.3390/cimb45030143>.
5. Xuan Da Pham, Hao Le Thi Hong, Huyen Tran Thi Thanh, Long Thanh Le, Hoa Vinh Le, Ninh Hanh Thi, Minh Le Tran, **Nguyen Thanh Trung**. Strains and virulence genes of *Salmonella* with multidrug resistance isolated from chicken carcasses (Hanoi, Vietnam). *Health Risk Analysis*, 2023, no. 1, pp. 115–123. DOI: 10.21668/health.risk/2023.1.11.eng