BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM

TRƯƠNG HUỲNH ANH VŨ

NGHIÊN CỨU TÍNH KHÁNG KHÁNG SINH Ở MỨC ĐỘ PHÂN TỬ CỦA *SALMONELLA* SPP. PHÂN LẬP TỪ THỰC PHẨM TẠI THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Chuyên ngành: CÔNG NGHỆ SINH HỌC
Mã số ngành: 9.42.02.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM

TRƯƠNG HUỲNH ANH VŨ

NGHIÊN CỨU TÍNH KHÁNG KHÁNG SINH Ở MỨC ĐỘ PHÂN TỬ CỦA *SALMONELLA* SPP. PHÂN LẬP TỪ THỰC PHẨM TẠI THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Chuyên ngành: **Công nghệ Sinh học**

Mã số: **9.42.02.01**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. NGUYỄN HOÀNG KHUÊ TÚ

Thành phố Hồ Chí Minh – Năm 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án "Nghiên cứu tính kháng kháng sinh ở mức độ phân tử của *Salmonella* spp. phân lập từ thực phẩm tại thành phố Hồ Chí Minh" là công trình của tôi thực hiện với sự hướng dẫn của PGS. TS Nguyễn Hoàng Khuê Tú. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án này là trung thực và chưa từng được người khác công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

TÁC GIẢ LUẬN ÁN

TRƯƠNG HUỲNH ANH VŨ

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, trước tiên tôi xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Cô PGS. TS Nguyễn Hoàng Khuê Tú đã dành nhiều thời gian, công sức và tận tình hướng dẫn, truyền đạt những kiến thức, kinh nghiệm quý báu trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám hiệu Trường Đại học Nông Lâm TP. HCM; quý Thầy/Cô trong Khoa Khoa học Sinh học; Phòng Đào tạo Sau đại học đã nhiệt tình giúp đỡ, hướng dẫn thực hiện các thủ tục theo quy chế đào tạo nghiên cứu sinh để tôi có thể hoàn thành chương trình học tập đúng tiến độ.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám đốc Sở Khoa học và Công nghệ; Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ TP. HCM; Ban Giám đốc và toàn thể Anh/Chị/Em Phòng Vi sinh; Phòng Hành chính Quản trị, Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm TP. HCM đã ủng hộ và hỗ trợ về kinh phí, trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất,…để thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn Ban Giám đốc Trung tâm Kiểm nghiệm Vệ sinh An toàn Thực phẩm Khu vực phía Nam, Viện Y tế Công cộng TP. HCM; quý Thầy/Cô và các bạn sinh viên Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Công nghiệp TP. HCM đã động viên, giúp đỡ và chia sẽ kinh nghiệm trong quá trình thực hiện luận án.

Cuối cùng, sự thành công của luận án không thể không kể đến sự đóng góp không nhỏ của các thành viên trong gia đình, những người luôn ủng hộ, động viên và giúp tôi vượt qua rất nhiều khó khăn, trở ngại trong suốt thời gian học tập.

Chân thành cám ơn./.

TÓM TẮT

Luận án "Nghiên cứu tính kháng kháng sinh ở mức độ phân tử của *Salmonella* spp. phân lập từ thực phẩm tại thành phố Hồ Chí Minh" được thực hiện tại Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm thành phố Hồ Chí Minh. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. của các nhóm thực phẩm thu thập tại các chợ bán lẻ trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh từ 09/2019 đến 09/2020 là 16,84% (256/1.520). Nhóm mẫu thịt có tỷ lệ nhiễm cao nhất, tiếp theo là nhóm mẫu thủy hải sản và cuối cùng là nhóm mẫu rau củ quả có tỷ lệ lần lượt là 43,16% (164/380), 23,95% (91/380), 0,26% (01/380). Chưa ghi nhận trường hợp nào thuộc nhóm mẫu trứng có nhiễm *Salmonella.* Các kháng sinh TE, AMP, STR, C và SXT có tỷ lệ *Salmonella* spp. kháng từ 34,67% đến 52,00%. Ngược lại, 96,00% nhạy với CAZ. Từ 21 chủng *Salmonella* spp. có kiểu hình đa kháng định danh được 07 serovar, phổ biến nhất là *S.* Kentucky (8 chủng); *S.* Infantis (4 chủng); *S.* Agona và *S.* Potsdam (2 chủng); *S.* Saintpaul, *S*. Braenderup và *S.* Indiana (01 chủng). Các integron nhóm 1, 2 và 3 ở các serovar *Salmonella* đa kháng được phát hiện lần lượt là 100% (21/21), 52,38% (11/21) và 100% (21/21). Tỷ lệ *Salmonella* mang cùng lúc ba nhóm integron là 52,38% (11/21). Kết quả khảo sát vùng gen cassette dương tính với integron nhóm 1 chiếm 85,71%; nhóm 2 là 72,73%. Kết quả khảo sát phát hiện 100% serovar đều mang plasmid không tương hợp. Serovar mang nhiều plasmid nhất là Kentucky (08 plasmid); Potsdam (07 plasmid); Infantis, Saintpaul, Braenderup, Agona và 7:1,z6:UT (05 plasmid); Indiana và OMF:1,z6:UT (04 plasmid). Gen mã hóa sinh ESBL được phát hiện thì *bla*TEM chiếm tỷ lệ cao nhất 52,38%, đột biến tại vị trí codon 90 (Asp90Gly) trên chủng SA11/19 3497. Gen *bla*CTX có tỷ lệ 19,05%, đột biến tại vị trí codon 80 (Ala80Val) trên các chủng SA07/20 1066, SA07/20 1067 và SA12/19 1600. Gen kháng nhóm quinolon, đột biến được phát hiện trên gen *gyr*A (Ser83Phe; Asp87Asn) và *par*C (Thr57Ser; Ser80Ile; Ser395Asn; Ala469Ser; Thr620Ala). Ngoài ra, chúng tôi còn ghi nhận tính đa kháng của các *Salmonella enterica* sups. serovar Kentucky có liên quan đến yếu tố di truyền chuyển vị là *Tn*21 mã hóa *Urf*2 hiện nay chưa có công bố nào mô tả chi tiết chức năng hoạt động của chúng.

SUMMARY

The thesis "Research on molecular characteristics of antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from food in Ho Chi Minh City" was performed at the Center of Analytical Service and Experimentation Ho Chi Minh City. The results showed that the contaminated rate of *Salmonella* spp. was 16.84% (256/1,520). Meat samples had the highest contamination rate, followed by the seafood samples and finally fruit and vegetable samples which were 43.16% (164/380), 23.95% (91/380), 0.26% (01/380), respectively. There was no *Salmonella* detected in the egg samples. Testing the antibiotic sensitivity of 150 isolated *Salmonella* strains showed that of the resistantt rates to AMP, STR, C, and SXT were from 34.67% to 52.00%. In contrast, *Salmonella* spp. were highly susceptible to CAZ (96.00%). There were 07 serovar phenotypes determined from 21 strains of multidrug-resistant *Salmonella* spp. in which the most common ones were *S*. Kentucky (8 strains); *S*. Infantis (4 strains); *S.* Agona and *S.* Potsdam (2 strains); *S.* Saintpaul, *S.* Braenderup, and *S.* Indiana (01 strain). Specifically, all integrons (I, II, and III) were found in multidrug-resistant *Salmonella* serovars isolated from food groups at 100% (21/21), 52.38% (11/21), and 100% (21/21), respectively. The rate of *Salmonella* carrying all three integron groups was 52.38% (11/21). The assessment of the gene cassette region of integron I was accounted for 85.71%; group 2 was 72.73%. We found that 100% of serovars carried plasmids incompatibility. Serovar carrying the most plasmids was Kentucky (8 plasmids); Potsdam (7 plasmids); Infantis, Saintpaul, Braenderup, Agona and 7:1,z6:UT (5 plasmids); Indiana and OMF:1,z6:the UT (4 plasmids). In the detection of ESBL encoding genes, the *bla*TEM gene accounted for the highest rate of 52.38%, mutations at codon position 90 (Asp90Gly) on strain SA11/19 3497. The *bla*CTX gene had the rate of 19.05%, mutations varying at codon position 80 (Ala80Val) on strains SA07/20 1066, SA07/20 1067 and SA12/19 1600. The resistance genes against the quinolone group, mutations were detected in the *gyr*A (Ser83Phe; Asp87Asn) and *par*C (Thr57Ser; Ser80Ile; Ser395Asn; Ala469Ser; Thr620Ala) genes. Interestingly, we noted the multi-resistance of *Salmonella enterica* sups.

Kentucky serovars which were related to the translocation genetic factor *Tn*21 encoding *Urf*2 that was not studied or described the function in detail.

KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
Ala	Alanine	
AMC	Amoxicillin/Clavunic acid	Kháng sinh Amoxicillin/Clavunic acid
AMP	Ampicillin	Kháng sinh Ampicillin
Asn	Asparagine	
Asp	Aspartic acid	
AX	Amoxicillin	Kháng sinh Amoxicillin
C	Chloramphenicol	Kháng sinh Chloramphenicol
CAZ	Ceftazidime	Kháng sinh Ceftazidime
CRO	Ceftriaxone	Kháng sinh Ceftriaxone
CS	Conserved segment	Vùng bảo tồn
CI	Confidence Interval	Khoảng tin cậy
CIP	Ciprofloxacin	Kháng sinh Ciprofloxacin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute	Viện tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm
CTX	Cefotaxime	Kháng sinh Cefotaxime
DNA	Deoxyribonucleic Acid	
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control	Trung tâm Phòng chống Dịch bệnh châu Âu
EFSA	European Food Safety Authority	Cơ quan An toàn Thực phẩm châu Âu
ESBL	Extended Spectrum Beta-lactamase	Beta lactamase phổ rộng
FX	Furazolidone	Kháng sinh Furazolidone
Gly	Glycine	
GM	Gentamycin	Kháng sinh Gentamycin
Ile	Isoleucine	
K	Kanamycin	Kháng sinh Kanamycin
kbp	Kilobase pairs	Cặp bazơ
MLST	Multi Locus Sequence Typing	Giải trình tự nhiều locus
MIC	Minimal Inhibited Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
m-PCR	Multiplex-PCR	PCR đa mồi
NA	Nalidixic acid	Kháng sinh Nalidixic acid
NARMS	National Antimicrobial Resistance Monitoring System	Hệ thống giám sát kháng khuẩn quốc gia Hoa Kỳ

NOR	Norfloxacin	Kháng sinh Norfloxacin
NTS	Non-typhoidal *Salmonella*	*Salmonella* không gây sốt thương hàn
OFX	Ofloxacin	Kháng sinh Ofloxacin
orf	Open reading frame	Khung đọc mở
P	Penicillin	Kháng sinh Penicillin
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
Phe	Phenylalanine	
PMQR	Plasmid Mediated Quinone Resistance	Gen kháng quinolone nằm trên plasmid
ppm	Parts Per Million	Phần triệu
qac	Quaternary ammonium compounds	Hợp chất amoni bậc 4
RA	Rifampin	Kháng sinh Rifampin
RNA	Ribonucleic Acid	
RNAi	RNA interference	Sự can thiệp RNA
Ser	Serine	
SMZ	Sulphamethoxazole	Kháng sinh Sulphamethoxazole
SPI	*Salmonella* Pathogenicity Islands	Đảo gây bệnh *Salmonella*
SPT	Spectinomycin	Kháng sinh Spectinomycin
STR	Streptomycin	Kháng sinh Streptomycin
SXT	Sulfamethoxazole/Trimethoprim	Kháng sinh Sulfamethoxazole/Trimethoprim
s-PCR	Simplex-PCR	PCR đơn mồi
T	Oxytetracycline	Kháng sinh Oxytetracycline
TE	Tetracycline	Kháng sinh Tetracycline
Thr	Threonine	
TMP	Trimethoprim	Kháng sinh Trimethoprim
TOB	Tobramycin	Kháng sinh Tobramycin
Val	Valine	
WHO	World Health Organization	Tổ chức y tế thế giới

MỤC LỤC

TRANG

LỜI CẢM ƠN ---------- i
TÓM TẮT ---------- ii
SUMMARY ---------- iii
KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT ---------- v
MỤC LỤC ---------- vii
DANH MỤC CÁC BẢNG ---------- xi
MỞ ĐẦU ---------- 1
Đóng góp mới của luận án ---------- 2
CHƯƠNG 1 ---------- 3
TỔNG QUAN ---------- 3
1.1 Tình hình thực phẩm nhiễm *Salmonella* spp. trên thế giới ---------- 3
1.2 Tình hình thực phẩm nhiễm *Salmonella* spp. tại Việt Nam ---------- 4
1.3 Thực trạng sử dụng và tồn dư kháng sinh ---------- 5
1.4 Tình hình kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. trên thế giới ---------- 6
1.5 Tình hình kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. tại Việt Nam ---------- 7
1.6 Đặc điểm sinh học của *Salmonella* spp. ---------- 9
1.6.1 Đặc điểm hình thái ---------- 9
1.6.2 Đặc tính nuôi cấy ---------- 9
1.6.3 Đặc tính sinh hóa ---------- 9
1.6.4 Phân loại ---------- 10
1.6.5 Hệ gen của *Salmonella* spp. ---------- 11
1.7 Cơ chế kháng aminoglycoside của *Salmonella* spp. ---------- 12
1.8 Cơ chế kháng β-lactam của *Salmonella* spp. ---------- 13
1.9 Cơ chế kháng phenicol của *Salmonella* spp. ---------- 14
1.10 Cơ chế kháng quinolone của *Salmonella* spp. ---------- 15
1.11 Cơ chế kháng tetracycline của *Salmonella* spp. ---------- 15
1.12 Cơ chế kháng sulfonamide/trimethoprim của *Salmonella* spp. ---------- 16

1.13 Tình hình nghiên cứu gen kháng kháng sinh của *Salmonella* spp.---------- 16
1.14 Yếu tố di truyền di động ---------- 18
1.14.1 Plasmid---------- 18
1.14.2 Integron ---------- 19
1.14.2.1 Integron nhóm 1 ---------- 20
1.14.2.2 Integron nhóm 2 ---------- 21
1.14.2.3 Integron nhóm 3, 4 và 5 ---------- 21
1.14.3 Gen cassette ---------- 22
CHƯƠNG 2 ---------- 23
PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU---------- 23
2.1 Vật liệu ---------- 23
2.1.1 Nguyên liệu ---------- 23
2.1.2 Môi trường nuôi cấy, hóa chất, thuốc thử dùng phân lập *Salmonella* spp.---- 23
2.1.3 Môi trường dùng khảo sát tính nhạy với kháng sinh của *Salmonella* spp. ---- 24
2.1.4 Hóa chất sinh học phân tử ---------- 24
2.1.5 Chủng chuẩn vi sinh vật dùng làm kiểm soát ---------- 25
2.1.6 Thiết bị ---------- 25
2.2 Phương pháp ---------- 26
2.2.1 Phương pháp xác định cỡ mẫu ---------- 26
2.2.2 Phương pháp lấy và bảo quản mẫu ---------- 26
2.3 Phương pháp phân lập *Salmonella* spp. ---------- 26
2.3.1 Chuẩn bị mẫu thử và huyền phù ban đầu ---------- 26
2.3.2 Tăng sinh sơ bộ không chọn lọc ---------- 26
2.3.3 Tăng sinh chọn lọc---------- 27
2.3.4 Phân lập ---------- 27
2.3.5 Khẳng định---------- 27
2.4 Phương pháp xác định serovar của *Salmonella* spp. ---------- 28
2.5 Khảo sát tính nhạy với kháng sinh của *Salmonella* spp. ---------- 29
2.5.1 Lựa chọn kháng sinh thử nghiệm ---------- 29

2.5.2 Phương pháp xác định tính nhạy với kháng sinh của *Salmonella* spp --------- 29
2.6 Ly trích DNA của *Salmonella* spp. ---------- 29
2.7 Phương pháp phát hiện *Salmonella* spp. bằng kỹ thuật PCR---------- 30
2.8 Phương pháp nghiên cứu đặc điểm phân tử liên quan đến sự đa kháng của *Salmonella* ---------- 30
2.8.1 Khảo sát sự hiện diện plasmid không tương hợp của các chủng *Salmonella* - 30
2.8.2 Khảo sát sự hiện diện của các nhóm integron và vùng gen cassette ---------- 30
2.8.3 Khảo sát sự hiện diện gen kháng kháng sinh của *Salmonella* spp.---------- 33
2.8.4 Thành phần và quy trình nhiệt của các phản ứng s-PCR ---------- 33
2.8.5 Thành phần và quy trình nhiệt của các phản ứng m-PCR ---------- 34
2.8.6 Điện di và đọc kết quả---------- 34
2.9 Giải trình tự thế hệ mới---------- 34
2.10 Phương pháp xử lý số liệu ---------- 35
CHƯƠNG 3 ---------- 38
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN ---------- 38
3.1 Xác định tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. đối với các nhóm thực phẩm---------- 38
3.2 Đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp.---------- 43
3.2.1 Khả năng kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp. ---------- 43
3.2.2 Khả năng kháng từng loại kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp. -------- 46
3.2.3 Khả năng kháng từng loại kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp. theo nguồn phân lập ---------- 49
3.2.4 Kiểu hình kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp. ---------- 51
3.3 Kết quả xác định serovar của *Salmonella* spp. đa kháng ---------- 52
3.4 Mức độ kháng từng loại kháng sinh của serovar theo nguồn phân lập ---------- 54
3.5 Sự hiện diện các nhóm integron của *Salmonella* ---------- 56
3.6 Đặc điểm vùng gen cassette của *Salmonella* dương tính với integron 1, 2------ 60
3.7 Đặc điểm plasmid của *Salmonella* spp. ---------- 64
3.8 Sự hiện diện gen mã hóa sinh ESBL ---------- 69
3.9 Sự hiện diện gen kháng nhóm tetracyline---------- 70

3.10 Sự hiện diện gen kháng nhóm phenicol ---------- 74
3.11 Sự hiện diện gen kháng nhóm quinolon ---------- 74
3.12 Sự hiện diện gen kháng nhóm aminoglycoside ---------- 78
3.13 Sự hiện diện gen kháng nhóm sulfonamide ---------- 80
3.14 Phân tích mối quan hệ các nhóm gen kháng với cơ chế đa kháng của *Salmonella* ---------- 84
3.14.1 Đánh giá chất lượng giải trình tự ---------- 84
3.14.2 Lắp ráp de novo và xác định nguồn gốc contigs ---------- 84
3.14.3 Kết quả giải trình tự nhiều locus (MLST) và xác định serotype ---------- 85
3.14.4 Phân tích nhóm gen kháng liên quan yếu tố di truyền di động ---------- 86
3.14.5 Phân tích các nhóm gen kháng kháng sinh của *Salmonella* ---------- 87
3.14.5.1 Nhóm gen liên quan đến kháng nhóm β-lactam ---------- 93
3.14.5.2 Nhóm gen liên quan đến kháng nhóm phenicol ---------- 94
3.14.5.3 Nhóm gen liên quan đến kháng nhóm quinolon ---------- 94
3.14.5.4 Nhóm gen liên quan đến kháng nhóm aminoglycoside ---------- 96
3.14.5.5 Nhóm gen liên quan đến kháng nhóm tetracycline ---------- 97
3.14.5.6 Nhóm gen liên quan đến kháng nhóm sulfonamide/trimethoprim --------- 98
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ ---------- 99
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ ----------100
TÀI LIỆU THAM KHẢO ----------101
PHỤ LỤC ----------115

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Danh sách khoanh giấy kháng sinh 24
Bảng 2.2. Trình tự các cặp mồi khảo sát sự hiện diện plasmid 31
Bảng 2.3. Trình tự các cặp mồi khảo sát sự hiện diện gen kháng kháng sinh 36
Bảng 3.1. Địa điểm thu thập mẫu.....38
Bảng 3.2. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. đối với từng nhóm thực phẩm.....39
Bảng 3.3. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. đối với thịt heo, bò, gà 40
Bảng 3.4. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. đối với mẫu cá, tôm, mực 41
Bảng 3.5. Mức độ kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. 43
Bảng 3.6. Mức độ kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. từ thịt heo, gà, bò 44
Bảng 3.7. Mức độ kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. từ cá, mực, tôm 45
Bảng 3.8. Mức độ kháng từng loại kháng sinh của *Salmonella* spp. 46
Bảng 3.9. Mức độ kháng từng loại kháng sinh của *Salmonella* spp. từ heo, gà, bò .49
Bảng 3.10. Mức độ kháng từng loại kháng sinh của *Salmonella* spp. từ cá, mực, tôm 50
Bảng 3.11. Kết quả xác định serovar các chủng *Salmonella* spp. đa kháng.....53
Bảng 3.12. Số lượng serovar đa kháng kháng sinh theo nguồn phân lập 55
Bảng 3.13. Sự hiện diện các nhóm integron của serovar *Salmonella* 58
Bảng 3.14. Sự hiện diện các vùng gen cassette thuộc integron 1 của *Salmonella*....62
Bảng 3.15. Tỷ lệ mang plasmid đối với các serovar của *Salmonella* 64
Bảng 3.16. Tỷ lệ phát hiện các loại plasmid trên các serovar *Salmonella*.....65
Bảng 3.17. Số lượng plasmid và kiểu hình kháng kháng sinh của *Salmonella* 67
Bảng 3.18. Sự hiện diện gen mã hóa sinh ESBL và kháng tetracycline.....72
Bảng 3.19. Sự hiện diện gen kháng nhóm phenicol và quinolon.....76
Bảng 3.20. Sự hiện diện gen kháng nhóm aminoglycoside và sulfonamide 82
Bảng 3.21. Chất lượng giải trình tự của serovar 84
Bảng 3.22. Kết quả xác định serotype của chủng phân lập 85
Bảng 3.23. Số lượng các gen và kiểu hình kháng kháng sinh của *Salmonella*.....90

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Sơ đồ phân loại *Salmonella* (Achtman và ctv, 2012) 10
Hình 1.3. Số lượng các gen kháng kháng sinh trên plasmid của *Salmonella* Typhimurium (Kudirkiene và ctv, 2018) 18
Hình 2.1. Tóm tắt sơ đồ nghiên cứu.....23
Hình 3.1. Kết quả xác định các nhóm integron ở *Salmonella* 57
Hình 3.2. Kết quả xác định gen mã hóa sinh ESBL.....69
Hình 3.3. Kết quả xác định gen *tet*A, *tet*B mã hóa kháng tetracyline.....70
Hình 3.4. Kết quả xác định gen *tet*C mã hóa kháng tetracyline.....71
Hình 3.5. Kết quả xác định gen *cmlA, cmlB và flo* mã hóa kháng phenicol.....74
Hình 3.6. Kết quả xác định gen *gyr*A, *gyr*B mã hóa kháng quinolon.....75
Hình 3.7. Kết quả xác định gen *str*A, *str*B mã hóa kháng aminoglycoside.....79
Hình 3.8. Kết quả xác định gen *aad*A2, *aad*B mã hóa kháng aminoglycoside 79
Hình 3.9. Kết quả xác định gen *sul*1, *sul*2 mã hóa kháng sulfonamide 80

MỞ ĐẦU

Ngày nay, kháng sinh không chỉ dùng để điều trị bệnh cho người mà còn được sử dụng rộng rãi trong nông nghiệp với mục đích phòng, trị bệnh cho vật nuôi, thủy hải sản, thậm chí còn được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi với mục đích kích thích tăng trưởng. Điều này đã làm xuất hiện và gia tăng khả năng kháng kháng sinh của các vi sinh vật, tác động tiêu cực đến tính bền vững chuỗi sản xuất lương thực, nông nghiệp, môi trường sinh thái bị ô nhiễm nghiêm trọng, ảnh hưởng đến sức khỏe và đời sống của người dân. Kháng kháng sinh được dự đoán sẽ là nguyên nhân của khoảng 10 triệu trường hợp tử vong hàng năm vào năm 2050 và gây thiệt hại trên 100 nghìn tỷ USD trên toàn thế giới (O'neill và ctv, 2016).

Ước tính mỗi năm trên toàn thế giới có khoảng 93,8 triệu ca nhiễm, 155.000 ca tử vong, nguyên nhân chính của hàng loạt vụ ngộ độc thực phẩm quy mô lớn trong những năm qua liên quan đến vi khuẩn *Salmonella*. Nguồn nhiễm *Salmonella* vào thực phẩm chủ yếu từ nguyên liệu hoặc do quá trình chế biến, đóng gói và bảo quản. Cho đến nay, hơn 2.500 kiểu huyết thanh *Salmonella* đã được xác định và hơn một nửa trong số đó thuộc về *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, chiếm phần lớn các ca nhiễm ở người. Bên cạnh đó, thực trạng kháng kháng sinh ngày càng tăng, đặc biệt là nhóm vi khuẩn Gram âm, đang là mối nguy lớn đối với sức khoẻ cộng đồng. Sự xuất hiện và gia tăng *Salmonella* đa kháng với nhiều loại kháng sinh, bao gồm cả những loại kháng sinh quan trọng được sử dụng trong lâm sàng như ceftriaxone và ciprofloxacin đang có tác động lớn đến hiệu quả điều trị và dẫn đến tỷ lệ tử vong cao (Divek và ctv, 2018).

Tại Việt Nam hệ thống giám sát vi khuẩn *Salmonella* kháng kháng sinh trong thực phẩm chưa được thiết lập hoặc có nhưng chưa mang tính liên tục; các chương trình, kế hoạch, hoạt động trong những năm gần đây cho biết *Salmonella* kháng kháng sinh thường tập trung từ nguồn bệnh phẩm còn từ thực phẩm thì chưa có nhiều báo cáo đầy đủ, toàn diện, đặc biệt tình trạng đa kháng của *Salmonella*. Hơn nữa, các nghiên cứu về sự hiện diện của gen kháng cũng như khả năng đa kháng kháng sinh có liên quan đến các yếu tố di truyền di động như plasmid, tranposon và integron của

Salmonella phân lập từ nguồn thực phẩm tại thành phố Hồ Chí Minh còn nhiều hạn chế. Chính vì sự cần thiết và ý nghĩa thực tiễn đã nêu ở trên chúng tôi chọn và tiến hành thực hiện ***"Nghiên cứu tính kháng kháng sinh ở mức độ phân tử của Salmonella* spp. *phân lập từ thực phẩm tại thành phố Hồ Chí Minh"*** được thực hiện với hai mục tiêu cụ thể sau:

1. Khảo sát tỷ lệ nhiễm, xác định mức độ nhạy với kháng sinh của *Salmonella* spp. phân lập từ các nhóm thực phẩm khác nhau tại các chợ bán lẻ trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh.

2. Nghiên cứu các đặc điểm phân tử liên quan đến cơ chế kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. phân lập từ thực phẩm. Xác định và phân tích mối quan hệ giữa các nhóm gen kháng với sự hiện diện của integron, các vùng gen cassette, các plasmid không tương hợp đối với *Salmonella* spp. có kiểu hình đa kháng.

Đóng góp mới của luận án

Luận án đã xác định tỷ lệ kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. trong thực phẩm (thịt, thủy hải sản, rau củ quả, trứng) tại thành phố Hồ Chí Minh.

Luận án xác định được đặc điểm của các gen và yếu tố liên quan tính kháng kháng sinh (nhóm integron, kiểu plasmid không tương hợp) của các serovar *Salmonella* spp. phân lập từ thực phẩm.

Luận án phát hiện các đột biến mới trên các gen *bla*TEM/blaCTX mã hoá sinh ESBL và các gen *gyr*A*, par*C liên quan đến kháng kháng sinh nhóm quinolon dựa trên kết quả giải trình tự. Đã đăng ký accession number tại Ngân hàng Cơ sở Dữ liệu DNA (DDBJ), Nhật Bản.

CHƯƠNG 1
TỔNG QUAN

1.1 Tình hình thực phẩm nhiễm *Salmonella* spp. trên thế giới

Trên thế giới, các vụ ngộ độc thực phẩm do vi sinh vật chiếm khoảng 70% tổng số ca ngộ độc thực phẩm. Tại các nước châu Á, vi khuẩn *Salmonella* spp. là nguyên nhân hàng đầu gây ra các vụ ngộ độc, chủ yếu ở các nước Nhật Bản, Trung Quốc và trong khu vực Đông Nam Á. Theo một báo cáo hàng năm của EFSA và ECDC, cứ ba vụ ngộ độc thực phẩm ở Châu âu năm 2018 thì gần một vụ là do *Salmonella* gây ra. Các quốc gia thành viên Châu âu đã báo cáo 5.146 vụ ngộ độc thực phẩm ảnh hưởng đến 48.365 người, 1.581 trong số các vụ ngộ độc là do *Salmonella*, 67% trong số đó có nguồn gốc từ Slovakia, Tây Ban Nha và Ba Lan, chủ yếu liên quan đến trứng.

Lai và ctv (2014) khi xác định sự phân bố serotype, mối quan hệ di truyền và kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. từ thực phẩm có nguồn gốc động vật ở tỉnh Sơn Đông-Trung Quốc trong năm 2009 và 2012 cho thấy 50 trong số 692 mẫu thịt heo dương tính với vi khuẩn *Salmonella* spp. Các serovar phổ biến nhất là *Salmonella* Derby 29 mẫu chiếm 58%, *Salmonella* Typhimurium 9 mẫu chiếm 18% và *Salmonella* Enteriditis 6 mẫu chiếm 12%. Hơn 99% các vi khuẩn *Salmonella* spp. phân lập được kháng với ít nhất một kháng sinh và mức kháng của vi khuẩn trong năm 2012 cao hơn so với năm 2009. Trong năm 2011, tại Romania khi tiến hành thu thập 650 mẫu thịt gà và thịt heo từ các đơn vị sản xuất và thị trường bán lẻ khác nhau, có 149 mẫu phân lập nhiễm *Salmonella* spp. (22,92%) đã được thu hồi với 13 serovar khác nhau, các serovar chủ yếu là *Salmonella* Infantis*, Salmonella* Typhimurium*, Salmonella* Derby và *Salmonella* Colindale (Mihaiu và ctv, 2014).

Báo cáo khác cho biết, đã tiến hành thu thập 1096 mẫu thịt heo từ 20 chợ ở 4 thành phố của tỉnh Tô Giang-Trung Quốc từ tháng 8/2010 đến năm 2012. Kết quả cho thấy có 154 mẫu dương tính với *Salmonella* spp. trong tổng số 163 mẫu phân lập *Salmonella* spp. đã được thu hồi, với 14 serovar được xác định trong đó *Salmonella* Derby là phổ biến nhất (47,9%); tiếp theo là *Salmonella* Typhimurium (10,4%); *Salmonella* Meleagridis (9,2%), *Salmonella* Anatum (8,6%) và *Salmonella* London

(6,7%). Có 134 (82,2%) chủng kháng với ít nhất với một tác nhân kháng khuẩn và 41 (25,2%) kháng với hơn 3 kháng sinh (Li và ctv, 2014). Tadee và ctv (2014) đã xác định tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Salmonella* spp. tại 3 lò mổ đại diện của các tỉnh Chiang Mai và Lamphun của Thái Lan từ tháng 5 đến tháng 10/2013 cho thấy mức độ nhiễm và ô nhiễm tổng thể là 11,85%, 0,34 MPN/cm^2 tương ứng.

1.2 Tình hình thực phẩm nhiễm *Salmonella* spp. tại Việt Nam

Ở Việt Nam, tình trạng ngộ độc thực phẩm xảy ra ở hầu hết các địa phương trong cả nước. Số ca ngộ độc ngày càng tăng và mức độ nghiêm trọng đáng báo động, số người ngộ độc thực phẩm dẫn đến tử vong không phải là hiếm. Bộ Y tế (2008) đã tổng hợp số liệu thống kê của Cục an toàn Vệ sinh thực phẩm trong vòng 8 năm (2000-2007) cho thấy: nước ta, xảy ra 1.616 vụ ngộ độc thực phẩm làm 41.898 người mắc, 436 người tử vong thì có 178 vụ làm 4.036 người mắc và 7 người tử vong do sử dụng thức ăn đường phố. Trong số các nguyên nhân gây ngộ độc thực phẩm thì nguyên nhân do vi sinh vật chiếm tỷ lệ cao nhất (43,20%).

Khi kiểm tra 60 mẫu thịt trên địa bàn Hà Nội năm 2006: Số mẫu không đạt do nhiễm *Salmonella* spp. chiếm 30,00% (Đỗ Ngọc Thúy và ctv, 2006). Phạm Hồng Ngân và ctv (2014) xác định tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. phân lập từ thịt heo ở một số chợ thuộc huyện Gia Lâm đã cho biết có 56/120 mẫu thịt heo bị nhiễm chiếm tỷ lệ 46,7%. Tỷ lệ này có sự khác nhau giữa các chợ với tỷ lệ dao động từ 30,0-66,7%. Lê Hữu Nghị và Tăng Mạnh Nhật (2005) đã tiến hành xác định *Salmonella* trong thịt bò và heo được lấy tại các lò mổ và bày bán tại chợ Đông Ba, chợ Tây Lộc-Huế và cho thấy 11/44 mẫu kiểm tra không đạt (25,00%). Công bố khác về tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. ở thân thịt heo là 55,90% và thịt gà là 64,00% (Võ Thị Trà An và ctv, 2006). Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh đã lấy 1.150 mẫu thịt heo, gà, bò tươi sống tại các chợ trên địa bàn thành phố để xét nghiệm. Kết quả, 385 mẫu thịt nhiễm *Salmonella* spp. Trong đó, tỷ lệ nhiễm trong thịt heo cao nhất gần 40%, thịt gà hơn 35%, thịt bò gần 31%. Tính trung bình, tỷ lệ thịt động vật tươi sống bày bán tại các chợ nhiễm *Salmonella* spp. chiếm tới 32,26% (Trần Thị Thùy Giang và ctv, 2014). Lê Văn Du và Hồ Thị Kim Hoa (2017), với tổng số 150 mẫu thịt kiểm tra thì

phát hiện 40,67% mẫu nhiễm *Salmonella*. Tỉ lệ nhiễm vi khuẩn này trên thịt heo là 43,75% và gà là 37,14%. Kết quả này cao hơn kết quả khảo sát các mẫu thịt được lấy tại các cơ sở giết mổ tại thành phố Hồ Chí Minh năm 2014 với tỉ lệ nhiễm *Salmonella* spp. trên thịt heo và gà là 31,6%. Tuy nhiên, kết quả khảo sát năm 2014 lại thấp hơn kết quả khảo sát của nhóm tác giả Nguyễn Thanh Long (2015) trên thịt heo và gà bán tại các chợ lần lượt là 43,3% và 41,6%.

1.3 Thực trạng sử dụng và tồn dư kháng sinh

Thực trạng sử dụng kháng sinh phổ biến trong nông nghiệp, trong thức ăn chăn nuôi, điều trị và dự phòng cũng góp phần làm gia tăng tình trạng kháng kháng sinh (Nguyen và ctv, 2013). Mặc dù số liệu về thực trạng sử dụng kháng sinh trên gia cầm còn tương đối hạn chế, ước tính mức tiêu thụ chung đối với kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi ở Việt Nam cho thấy ngành chăn nuôi gà sử dụng 42,2 tấn kháng sinh (95% CI: 26,2-58,2) và chăn nuôi heo sử dụng 981,3 tấn kháng sinh mỗi năm (95% CI: 616,5-1346,0) và tổng cộng có 1.023,5 tấn kháng sinh được sử dụng hàng năm (95% CI: 642,8-1404,2) (Carrique-Mas, 2015). Bên cạnh đó, tồn dư kháng sinh trong thực phẩm là một vấn đề đáng quan tâm, mối nguy làm gia tăng thực trạng kháng kháng sinh vi sinh vật, ảnh hưởng tới hệ miễn dịch và đường hô hấp, gây ung thư (SMZ, T và FX); bệnh ở thận (GN); độc cho gan, tuỷ xương (C) và dị ứng (P và TE).

Năm 2007, các cơ sở chăn nuôi tại Bình Dương, Lã Văn Kính ghi nhận kháng sinh chlortetracycline được sử dụng rộng rãi trong thức ăn (53,9%) với nồng độ trung bình là 140 ppm và cao nhất là 275 ppm, cao gấp 5-6 lần so với nồng độ khuyến cáo dùng với mục đích điều trị và kích thích tăng trưởng. Năm 2012 có 68/553 (12,3%) mẫu thịt có TE vượt mức giới hạn cho phép; năm 2013, có 24/94 mẫu (25,53%); năm 2014, phát hiện 7/300 mẫu (2,33%); và năm 2015 phát hiện 37/159 mẫu (23,27%) (Chi cục Thú y TP. HCM, 2015). Dư lượng enrofloxacin trong khảo sát này thấp hơn so với kết quả khảo sát các mẫu thịt gà ở 19 tỉnh miền Bắc trong cùng năm (2015) của Chử Văn Tuất và ctv (2016). Trong khảo sát này, 19/66 mẫu thịt gà có dư lượng enrofloxacin với hàm lượng cao từ 128,7-1161,0 µg/kg và 1,5% mẫu thịt gà có C.

Lê Văn Du và Hồ Thị Kim Hoa (2017) cho biết sulfadimidine được tìm thấy trong 14 mẫu thịt heo (17,5%) với hàm lượng từ 2-10.330 µg/kg, trong đó có 7 mẫu có dư lượng từ 103,3-10.330 µg/kg. NOR được tìm thấy trong 3 mẫu (3,75%) với hàm lượng từ 1,8-28,7 µg/kg, vượt mức giới hạn quy định tại Thông tư số 24/2013/TT-BYT của Bộ Y tế (MRL=100 µg/kg). Đặc biệt trong gần 1/3 số mẫu thịt gà có phát hiện enrofloxacin (32,86%) và 27,14% có florfenicol.

1.4 Tình hình kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. trên thế giới

Trong lịch sử, kháng sinh đầu tiên được sử dụng để điều trị bệnh thương hàn là AMP, SXT và C. Vào đầu những năm 1960, *Salmonella* đầu tiên kháng C đã được báo cáo. Kể từ đó, tần suất phân lập được *Salmonella* kháng một hoặc nhiều kháng sinh đã tăng lên ở nhiều nước trên thế giới. Các chủng *Salmonella* Typhi kháng ba loại kháng sinh này được coi là đa kháng và chúng được báo cáo vào cuối những năm 1970 đến đầu những năm 1980. Khả năng kháng fluoroquinolone cũng đã được báo cáo thường xuyên vì đây là kháng sinh hay được sử dụng để điều trị nhiễm *Salmonella* đa kháng. Ceftriaxone và azithromycin hiện nay cũng hay được sử dụng để điều trị sốt thương hàn khi không còn lựa chọn khác. Vì vậy, một số ít các trường hợp *Salmonella* Typhi kháng ceftriaxone hoặc azithromycin gần đây đã được báo cáo (Klemm và ctv, 2018). Trong hai thập kỷ qua, *Salmonella* Typhi H58 đa kháng đã lan rộng trên toàn cầu, phổ biến trên khắp các vùng Nam, Đông nam Châu Á và một phần của Châu Phi và châu Đại Dương. Đã có nhiều đợt bùng phát dịch sốt thương hàn ở địa phương do loài vi khuẩn này (Wong và ctv, 2015). Đối với *Salmonella* không gây sốt thương hàn, số chủng đa kháng đã tăng lên ở nhiều quốc gia kể từ lần đầu tiên xuất hiện chủng *Salmonella* Typhimurium DT104 đa kháng vào năm 1990 (Helms và ctv, 2005). Dựa trên dữ liệu từ năm 2005 đến năm 2006 được công bố bởi hệ thống giám sát kháng khuẩn quốc gia Hoa Kỳ, 84 % lượng *Salmonella* không gây sốt thương hàn phân lập trên lâm sàng là đa kháng kháng sinh và 4,1% giảm tính nhạy với cephalosporin ở Mỹ. Dữ liệu của NARMS (1996-2007) cũng cho thấy sự xuất hiện của các chủng *Salmonella* không gây sốt thương hàn có khả năng kháng NA và

CRO. Hiện tượng này đã gây ra khó khăn cho các cơ quan y tế công cộng về quản lý lâm sàng và phòng chống các bệnh nhiễm trùng (Crump và ctv, 2011).

Salmonella kháng kháng sinh chủ yếu là do lạm dụng kháng sinh trong điều trị bệnh ở người và chăn nuôi. Điều này gây ra nguy cơ lan truyền cao *Salmonella* đa kháng từ động vật sang người thông qua thức ăn hoặc nước uống, tiếp xúc trực tiếp hoặc tiêu thụ động vật bị nhiễm bệnh (Klemm và ctv, 2018). Monthon và ctv (2013) đã phát hiện *Salmonella* phân lập từ thịt heo và rau quả có khả năng kháng TE cao nhất (77% và 33%) trong khi *Salmonella* phân lập từ thịt gà có khả năng kháng STR cao nhất (92%). Tỷ lệ *Salmonella* đa kháng là 68% phân lập từ thịt heo (31 mẫu), 84% phân lập từ thịt gà (32 mẫu). Trong khi đó chỉ có 7 mẫu (29%) được phân lập từ rau có biểu hiện kháng hai loại kháng sinh trở lên.

Tại Nhật Bản, có 22 serovar được phát hiện trong đó phổ biến là *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Manhattan, *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Agona phân lập từ các mẫu thịt gà bán lẻ. Tỷ lệ kháng kháng sinh là 89,9%, trong đó 90,2% là đa kháng. Tỷ lệ kháng STR và TE ở mức cao với 81,8% và 77,8% (Katoh và ctv, 2015). Năm 2015, nghiên cứu kháng kháng sinh của *Salmonella* từ thịt gà bán lẻ và các lò mổ ở Romani. Có 8 serovar được phân lập, gồm *Salmonella* Infanti, *Salmonella* Bredeney, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Djugu, *Salmonella* Grampian, *Salmonella* Brandenburg, *Salmonella* Derby và *Salmonella* Ruzizi. TE là kháng sinh có tỷ lệ kháng cao nhất, không có chủng nào kháng CTX và CAZ (Tirziu và ctv, 2015). Trong nhiều năm, tỷ lệ *Salmonella* đa kháng ở Châu Phi và Châu Á có xu hướng tăng mạnh ở mức cao, đáng lưu ý là *Salmonella* Typhi (Klemm và ctv, 2018).

1.5 Tình hình kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. tại Việt Nam

Hơn 70% *Salmonella* Typhi phân lập được ở Việt Nam năm 1994 là đa kháng kháng sinh. Tỷ lệ *Salmonella* Typhi đa kháng vẫn cao kể từ năm 1993. Tỷ lệ kháng NA tăng mạnh từ 1993 (4%) đến 2005 (97%) (Chau và ctv, 2007). Khảo sát tình hình kháng của các loại vi khuẩn gây ô nhiễm thực phẩm tại Việt Nam năm 2007 cho thấy có tới 50,5% *Salmonella* kháng ít nhất một kháng sinh. Các chủng *Salmonella* phân

lập ở Việt Nam và các nước khác cho thấy, khả năng kháng của các chủng *Salmonella* ngày càng tăng (Van và ctv, 2007a; Yang và ctv, 2010; Wannaprasat và ctv, 2011). Trong đó *Salmonella* Enteritidis và Typhimurium là hai loài phổ biến. Nghiên cứu trên các mẫu thịt heo cho thấy nhiều serovar *Salmonella* có khả năng kháng mạnh với nhiều loại kháng sinh như TE (53.3%), AM (43,8%), C (37,5%) và SXT (31,3%) (Nguyen và ctv, 2016).

Thực trạng *Salmonella* trong thực phẩm kháng và đa kháng kháng sinh ở Việt Nam tăng lên theo các công bố hàng năm, cụ thể như sau: năm 2009, *Salmonella* phân lập từ thịt bò bán lẻ tại Hà Nội cho thấy tỷ lệ kháng ít nhất một kháng sinh là 58,7%, trong đó 46% là đa kháng. Tỷ lệ kháng các kháng sinh là: TE (46,0%), SXT (39,7%), AM (31,7%), STR (30,2%), TMP (28,6%), K (28,6%) và C (22,2%) (Thai và ctv, 2012). Năm 2012, nghiên cứu tình hình kháng kháng sinh của *Salmonella* phân lập từ thịt heo và gà bán lẻ ở miền Bắc cho thấy tỷ lệ kháng ít nhất một kháng sinh là 78,4%, có 14 serovar đa kháng. Điều này chỉ ra rằng tỷ lệ đa kháng giữa các loài *Salmonella* ngày càng tăng. Năm 2014, *Salmonella* phân lập từ thịt gà sống tại Việt Nam cho thấy tỷ lệ đa kháng là 17,7%, đặc biệt xuất hiện serovar kháng 9 loại kháng sinh. Các kháng sinh bị kháng cao là TE (59,1%) và AM (41,6%). Nguyên nhân có thể do tình trạng lạm dụng kháng sinh trong chăn nuôi (Thai và Yamaguchi, 2012). Việc bảo quản không đúng cách thịt gà sống đã gây nhiễm chéo và làm tăng tỷ lệ nhiễm *Salmonella*. Những kết quả này có thể hữu ích trong việc phát triển mô hình đánh giá nguy cơ và dự phòng lây nhiễm *Salmonella* từ thực phẩm sang người ở Việt Nam (Ta và ctv, 2014).

Ở một nghiên cứu khác, tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* từ 409 mẫu thịt và hải sản sống được thu thập từ tháng 10/2012 đến tháng 3/2015 từ các lò mổ, chợ bán lẻ ở thành phố Hồ Chí Minh. Các chủng *Salmonella* có tỷ lệ kháng kháng sinh rất cao (62,2%), đặc biệt là TE (53,3%), C (37,5%), SXT (31,3%) và AM (43,8%). Đã tìm thấy các chủng kháng với ba hoặc nhiều loại kháng sinh (41,1%). Quan tâm hơn, đối với các chủng như *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Indiana, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Saintpaul và *Salmonella* Bovismorbificans

thể hiện tính kháng với 6 nhóm kháng sinh (3,3%). Tất cả các chủng *Salmonella* Indiana đều kháng từ 4 đến 6 nhóm, bao gồm cả CIP, thường được sử dụng để điều trị nhiễm khuẩn *Salmonella* ở người. Những phát hiện trên, cho thấy sự xuất hiện các chủng *Salmonella* đa kháng là mối quan tâm về sức khỏe cộng đồng, việc sử dụng kháng sinh cho cả người và động vật ở Việt Nam cần được kiểm soát chặt chẽ và khoa học hơn trong tương lai (Nguyen và ctv, 2016).

1.6 Đặc điểm sinh học của *Salmonella* spp.

1.6.1 Đặc điểm hình thái

Salmonella spp. là vi khuẩn Gram âm, trực khuẩn, hai đầu tròn, không hình thành nha bào và giáp mô. Đa số đều có khả năng di động mạnh do có từ 7-12 lông xung quanh thân (trừ *Salmonella* Gallinarum và *Salmonella* Pullorum gây bệnh cho gia cầm), là loại vi khuẩn hiếu khí hoặc yếm khí tùy tiện (Quinn và ctv, 2002).

1.6.2 Đặc tính nuôi cấy

Nguyễn Như Thanh và ctv (2001) cho biết: vi khuẩn *Salmonella* spp. thích hợp với điều kiện hiếu khí nhưng cũng có thể phát triển trong điều kiện yếm khí, nhiệt độ thích hợp từ 35-37^{o}C. pH thích hợp từ 6,5-7,6. Trong môi trường nuôi cấy, *Salmonella* spp. bị ức chế với nồng độ 3-4% NaCl, khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn sẽ tăng khi tăng nồng độ NaCl và giảm nhiệt độ nuôi cấy. Một số trường hợp, vi khuẩn có thể phát triển ở nồng độ NaCl cao nếu nhiệt độ nuôi cấy tăng. Vi khuẩn *Salmonella* spp. dễ dàng phát triển ở các môi trường dinh dưỡng thông thường và rất khó phân biệt được với sự phát triển của các vi khuẩn đường ruột khác.

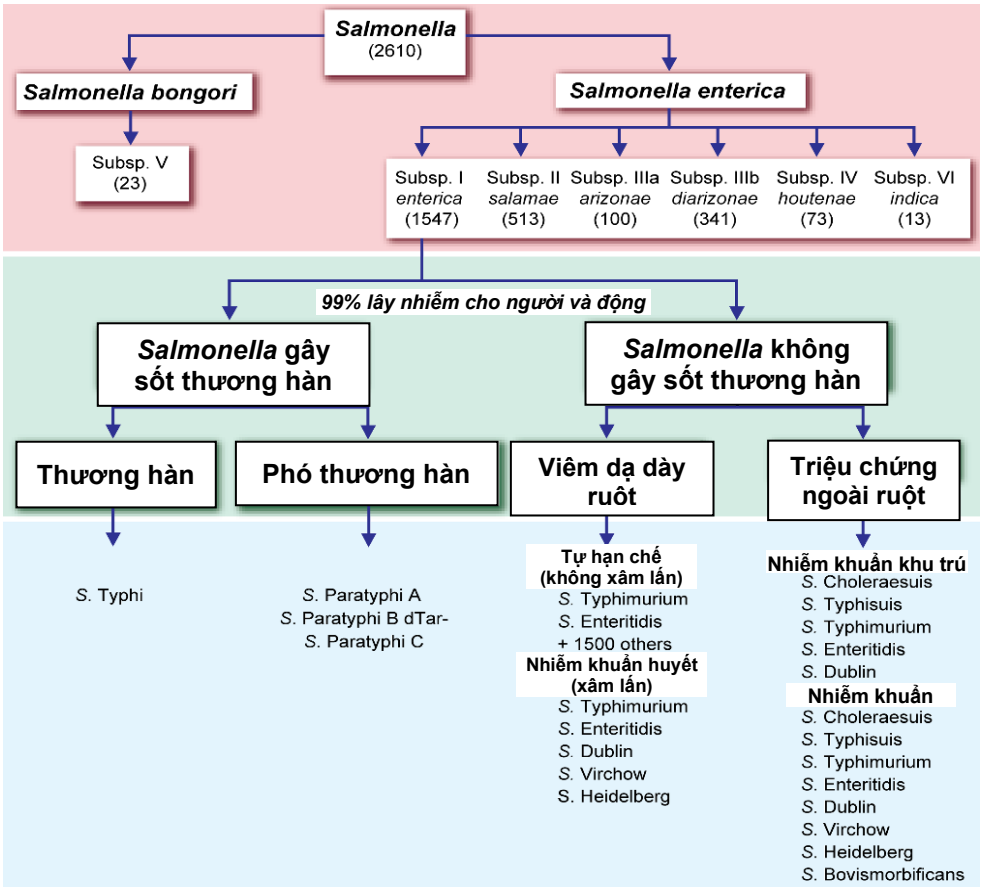
1.6.3 Đặc tính sinh hóa

Quinn và ctv (2002) cho biết: *Salmonella* được chia thành 7 phân nhóm, mỗi phân nhóm có khả năng lên men một số loại đường nhất định và không đổi như: glucoza, mannit, mantoza, galactoza, dulcitol, arabonoza, sorbitol và sinh hơi, không lên men lactoza và saccaroza. Đa số *Salmonella* không làm tan chảy gelatin, không phân giải urê, không sinh indol. Phản ứng methyl red, catalaza dương tính (trừ *Salmonella choleraesuis, Salmonella gallinarum, Salmonella pullorum* có phản ứng

methyl red âm tính). Phản ứng oxidaza âm tính. Phản ứng sinh H_2S dương tính (trừ *Salmonella paratyphi* A, *Salmonella typhisuis, Salmonella choleraesuis*).

1.6.4 Phân loại

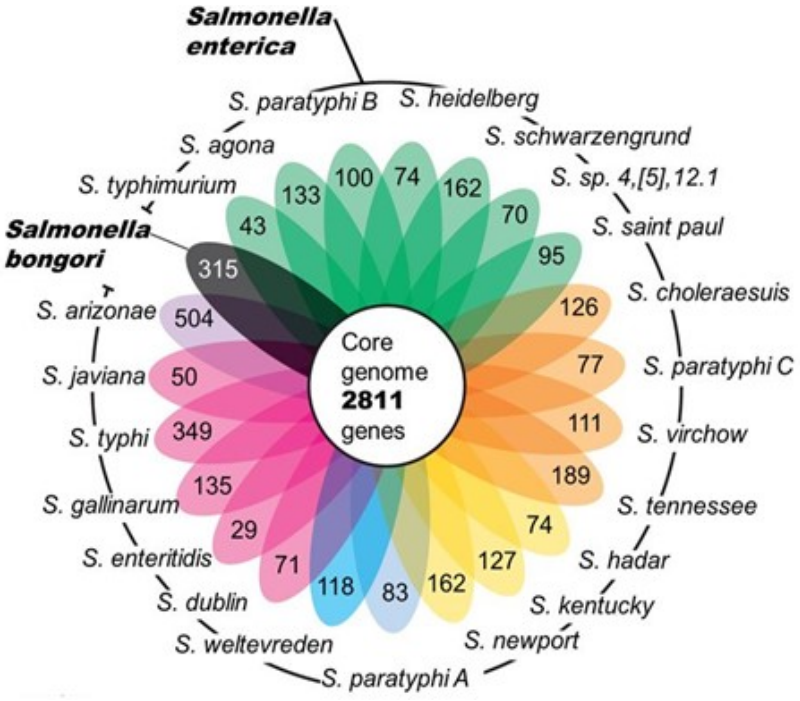
Lúc đầu, các loài *Salmonella* được đặt tên theo hội chứng lâm sàng mà chúng gây ra như *Salmonella* Typhi và các *Salmonella* Paratyphi A, B, C. *Salmonella* còn được đặt tên theo vật chủ như *Salmonella* Typhimurium gây bệnh ở chuột. Về sau người ta thấy rằng một loài *Salmonella* có thể gây ra một số hội chứng và có thể phân lập được ở nhiều loài động vật khác nhau. Vì thế, các loài mới phát hiện được đặt tên theo địa phương nơi nó lần đầu tiên được phát hiện. Ví dụ *Salmonella* Teheran, *Salmonella* Congo, *Salmonella* London. Bằng kỹ thuật sinh học phân tử, những nghiên cứu sâu về cấu trúc DNA cho phép xếp tất cả *Salmonella* vào một loài duy nhất. Tuy nhiên đề xuất này không được chấp nhận vì cách phân loại truyền thống đã được sử dụng quá quen và có ý nghĩa thực tiễn riêng (Lê Văn Phủng, 2012).



Hình 1.1. Sơ đồ phân loại *Salmonella* (Achtman và ctv, 2012)

1.6.5 Hệ gen của *Salmonella* spp.

Kích thước hệ gen của *Salmonella* rất khác nhau, dao động từ 3,39 đến 5,59 Mb. Số gen trung bình của *Salmonella* là 4.742 (dao động từ 3.969 đến 9.898 gen). Không có mối liên quan giữa kích thước hệ gen và số lượng gen. Ngoài ra, *Salmonella* còn sở hữu từ 1 đến 2 plasmid. Các plasmid của *Salmonella* có kích thước rất khác nhau, dao động từ 2 đến 200 kb. Tuy nhiên, hầu hết *Salmonella* enterica không có plasmid. Ví dụ, các serovar như *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Infantis và các serovar độc khác thường không có plasmid. Ngược lại, các *Salmonella* thường xuyên gây bệnh ở người và động vật, ví dụ, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Gallinarum và *Salmonella* Pullorum thường sở hữu plasmid. *Salmonella enterica* cần khoảng 3.499 gen và *Salmonella bongori* cần khoảng 3.368 gen để đảm bảo cho quá trình sinh trưởng bình thường (Wassenaar và ctv, 2017).



Hình 1.2. Số lượng các gen chung và riêng ở một số loài *Salmonella* (Jacobsen và ctv, 2011)

So sánh trình tự protein ở *Salmonella enterica* người ta thấy rằng chúng có độ tương đồng từ 65% đến 99%. *Salmonella* có tính ổn định cao trong hệ gen thường chỉ

tập trung vào một số vùng đặc biệt. Có khoảng 2.800 họ gen có mặt ở tất cả các *Salmonella* và tổng số họ gen của tất cả các serovar là khoảng 10.000. *Salmonella* có số lượng lớn các gen có tính ổn định cao, bên cạnh đó, số lượng các gen thu được trong quá trình sống cũng rất phong phú, bao gồm các đảo gây bệnh *Salmonella*, các yếu tố di truyền chuyển vị, thực khuẩn thể và plasmid. Các gen thu được thường biến đổi và khác nhau giữa các serovar (Jacobsen và ctv, 2011).Hệ gen của *Salmonella* rất giống với hệ gen của *E. coli* nhưng có thêm một số lượng lớn các gen độc tố. Một số các gen độc này tập trung thành các cụm trong hệ gen, còn được gọi là GI (là một đoạn DNA kích thước lớn, thu được nhờ hình thức chuyển ngang). Các GI nằm gần các gen tRNA, người ta cho rằng gen tRNA là nguyên nhân để tích hợp GI vào nhiễm sắc thể của *Salmonella*. Các GI và SPI có vai trò tạo ra độc tố và tạo ra khả năng xâm nhập của vi khuẩn. Nhiều SPI được tìm thấy nằm bên cạnh một gen mã hóa cho tRNA, tỷ lệ GC của chúng cũng khác so với tỷ lệ GC của hệ gen. Vì vậy, hầu hết các SPI là gen ngoại lai được chèn vào hệ gen của *Salmonella*. Hiện nay, đã tìm thấy 23 SPI, tuy nhiên, chức năng của các gen độc trên các SPI chưa được nghiên cứu đầy đủ. Ngoài SPI-1 và SPI-2 có được thông tin đầy đủ, vai trò gây bệnh của các SPI khác còn ít được biết đến (Elder và ctv, 2016).

Sự khác biệt chính trong hệ gen của *Salmonella* xảy ra chủ yếu do sự sắp xếp lại các gen liên quan đến tái tổ hợp của các operon rRNA khác nhau hoặc các yếu tố chèn IS200. Mỗi serovar tiến hóa thông qua việc tiếp nhận các yếu tố di truyền bằng chuyển gen theo chiều ngang hoặc do sự thoái biến các gen. Sự đa dạng trong hệ gen của *Salmonella* chủ yếu là do các SPI, plasmid và thực khuẩn thể. Trong đó, các thực khuẩn thể tích hợp vào hệ gen là một trong những yếu tố chính tạo ra sự đa dạng di truyền trong bộ gen của *Salmonella* (Thomson và ctv, 2004).

1.7 Cơ chế kháng aminoglycoside của *Salmonella* spp.

Có ba cơ chế kháng aminoglycoside ở vi khuẩn là: (1) làm giảm hấp thụ kháng sinh hoặc giảm tính thấm màng tế bào, (2) thay đổi các vị trí liên kết của kháng sinh trên ribosome và làm biến đổi kháng sinh, (3) ở *Salmonella*, khả năng kháng aminoglycoside là do các kênh bơm ngược thải kháng sinh ra khỏi tế bào. Cơ chế này

không đóng vai trò quan trọng trong kháng aminoglycoside ở *Salmonella* nhưng tạo điều kiện để kháng các kháng sinh khác. Chưa thấy báo cáo nào về biến đổi ribosome là nguyên nhân gây kháng aminoglycoside ở *Salmonella*. Loài vi khuẩn này sử dụng các cơ chế như biểu hiện các enzyme để biến đổi aminoglycoside qua trung gian plasmid để kháng kháng sinh này. Các enzyme này được phân loại thành ba nhóm và được đặt tên dựa trên các phản ứng mà chúng thực hiện, gồm phosphotransferase acetyltransferase, và nucleotidyltransferase (Abatcha và ctv, 2014).

Tùy thuộc vào khu vực mà enzyme làm biến đổi, người ta phân aminoglycoside acetyltransferase (AAC) thành bốn nhóm enzyme, bao gồm AAC (1), AAC (2'), AAC (3) và AAC (6'). Các gen mã hóa các enzyme này gọi là *aac*. Những gen này đã được tìm thấy ở nhiều serovar như *Salmonella* Agona*, Salmonella* Typhimurium*, Salmonella* Newport*, Salmonella* Copenhagen*, Salmonella* Kentucky. Aminoglycoside acetyltransferase có khả năng kháng TOB, GN, và K. Aminoglycoside phosphotransferase được chia thành hai nhóm tùy thuộc vào vị trí đặc hiệu mà chúng tiến hành phosphoryl hóa. Nhóm APH (3") và APH (6) có khả năng kháng STR. Hầu hết các gen mã hóa enzyme này được đặt tên là *aph*. Nucleotidyl transferase có khả năng kháng aminoglycoside, các enzyme này được chia thành nhiều nhóm dựa trên vị trí biến đổi các nhóm hydroxyl. Gen mã hóa các enzyme này thường được gọi là *aad*, một số gen còn được gọi là *ant*. Gen *aad*A còn được gọi là *ant (3")*, được tìm thấy ở *Salmonella*, có khả năng kháng STR. Gen *aad*B, còn được gọi là *ant (2')-Ia*, có khả năng kháng TOB và GN (Mascaretti, 2003).

1.8 Cơ chế kháng β-lactam của *Salmonella* spp.

Ở *Salmonella*, sản sinh enzyme β-lactamase là cơ chế phổ biến kháng kháng sinh nhóm β-lactam. Các enzyme này hoạt động bằng cách thủy phân các vòng cấu trúc của β-lactam, tạo ra các β axit amin không có hoạt tính kháng khuẩn. Người ta đã tìm ra hơn 340 gen mã hóa enzyme β-lactam thuộc các nhóm như *bla*TEM*, bla*OXA*, bla*PER*, bla*PSE*, bla*SHV*, bla*CTX-M và *bla*CMY, trong đó một số nhóm rất phổ biến ở *Salmonella*. Phân loại Ambler của enzyme β-lactam là phương pháp phân loại được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay. Theo đó, enzyme này được phân chia

thành bốn loại là A, B, C và D dựa trên trình tự của các axit amin của chúng. Trong đó loại A phổ biến nhất ở *Salmonella*, chúng có khả năng kháng penicillin, cephalosproin và carbapenem (Mascaretti, 2003). Có nhiều họ gen khác nhau mã hóa cho các enzyme này, trong đó, họ *TEM* là phổ biến nhất ở *Salmonella*. Các gen *bla*TEM-1 và *bla*TEM-52 đã được tìm thấy trong nhiều serovar gồm *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Haadrt, *Salmonella* Muenchen, *Salmonella* Panama và *Salmonella* Typhimurium (Khan và Zarrilli, 2012). Enzyme β-lactam loại C phổ biến thứ hai sau loại A, có khả năng kháng cephalosporin như cefoxitin và ceftiofur, enzyme này được mã hóa bởi gen *amp*C nằm trên nhiễm sắc thể. Gen *bla*CMY-2 có liên quan đến kháng ceftiofur, đây là kháng sinh thuộc nhóm cephalosporin thế hệ thứ ba và tương tự với CRO. Kháng kháng sinh này và sự lây lan của gen *bla*CMY-2 là một vấn đề lo ngại trên toàn thế giới vì ceftraxone là một trong những kháng sinh lựa chọn để điều trị nhiễm *Salmonella* ở trẻ sơ sinh. Nhiều serovar như *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Agona và *Salmonella* Newport đã được báo cáo là mang gen kháng kháng sinh này (Alcaine và ctv, 2005).

Enzyme β-lactam loại B có khả năng kháng tất cả các kháng sinh nhóm β-lactam, gen mã hóa enzyme này thường nằm trên nhiễm sắc thể, một số gen như *imp*-1 và *vim*-1 nằm trên plasmid. Enzyme β-lactamase loại D có khả năng kháng một số kháng sinh nhóm β-lactam như oxacillin, cloxacillin và methicillin. Gen *bla*OXA-1 được tìm thấy trong một số serovar. Tuy nhiên, enzyme loại B và D đều không phổ biến ở *Salmonella* (Abatcha và ctv, 2014).

1.9 Cơ chế kháng phenicol của *Salmonella* spp.

Chloramphenicol là chất ức chế tổng hợp protein bằng cách liên kết với trung tâm peptidyltransferase của đơn vị 50S ribosome (Mascaretti, 2003). Có hai cơ chế kháng C ở *Salmonella* gồm: (1) do chloramphenicol acetyltransferase hoặc gen *cml*A và (2) các kênh bơm thải C. Gen *flo*R mã hóa kênh bơm ngược thải kháng sinh rất phổ biến ở *Salmonella*, trong khi gen *cml*A ít phổ biến hơn. Gen *flo*R có tính di động cao, có mặt ở cả nhiễm sắc thể và plasmid, liên quan chặt chẽ với khả năng đa kháng kháng sinh của *Salmonella* (Abatcha và ctv, 2014).

1.10 Cơ chế kháng quinolone của *Salmonella* spp.

Quinolone hoạt động bằng cách ức chế hoạt động của topoisomerase II, DNA gyrase và topoisomerase IV, liên quan đến quá trình tổng hợp DNA, phiên mã và phân chia tế bào. Khả năng kháng quinolone ở *Salmonella* được phân thành 2 cơ chế: (1) đột biến các gen *gyr*A, *gyr*B mã hóa DNA gyrase và gen *par*C mã hóa topisomerase IV và (2) tăng biểu hiện của kênh bơm ngược thải kháng sinh AcrAB-TolC. Sự kết hợp nhiều đột biến sẽ tạo ra khả năng kháng quinolone hơn là một đột biến đơn lẻ (Abatcha và ctv, 2014). Ở một số vi khuẩn như *E. coli* và *Klebsiella*, biểu hiện các gen thuộc họ *qnr* cũng liên quan đến kháng quinolone. Plasmid chứa gen *qnr* có thể chuyển từ vi khuẩn khác vào *Salmonella* qua tiếp hợp. Tuy nhiên, khả năng kháng quinolone bởi gen này ở *Salmonella* là ít xảy ra (Cheung và ctv, 2005).

1.11 Cơ chế kháng tetracycline của *Salmonella* spp.

Cơ chế kháng TE được chia làm 3 hình thức, bao gồm: (1) tăng cường bơm ngược, (2) protein bảo vệ ribosome, (3) enzyme bất hoạt. Cho đến nay, có tới hơn 40 gen kháng TE đã được tìm thấy, trong đó có 38 gen *tet*, 3 gen *otr* và 1 gen *tcr*. Trong số đó, có 25 gen *tet*, 2 gen *otr* và 1 gen *tcr* là mã hóa cho các hệ thống bơm ngược, ngược lại có 10 gen *tet*, 1 gen *otr* mã hóa cho các protein bảo vệ ribosome (Levy và ctv, 1999). Đáng kể là nhóm gen *tet*(M), *tet*(U), *tet*(O/W) là những gen được tìm thấy nhiều ở cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương (Levy và ctv, 2005). Chính vì lý do đó, việc phát hiện một số gen liên quan đến kháng TE ở các chủng *Salmonella* phân lập từ thực phẩm có ý nghĩa rất quan trọng. Cơ chế chính để kháng TE ở *Salmonella* là do hệ thống các kênh bơm ngược thải kháng sinh, kênh này làm giảm nồng độ TE ở trong tế bào. Có 46 gen kháng TE đã được xác định (Nguyen và ctv, 2013). Hầu hết các gen kháng TE thuộc nhóm mã hóa kênh bơm thải TE (28 gen). Tiếp theo là các gen thuộc nhóm có chức năng loại bỏ TE bám vào ribosome vi khuẩn, còn gọi là gen bảo vệ ribosome. Chiếm tỷ lệ ít nhất là các gen mã hóa monooxygenase làm biến đổi kháng sinh TE (2 gen). Cuối cùng là các đột biến gen 16S rRNA làm giảm khả năng bám của TE với ribosome (Nguyen và ctv, 2013).

1.12 Cơ chế kháng sulfonamide/trimethoprim của *Salmonella* spp.

Những kháng sinh này có hoạt tính kìm khuẩn và cơ chế hoạt động là ức chế cạnh tranh các enzyme tham gia vào quá trình tổng hợp axit tetrahydrofolic. Sulfonamide ức chế dihyrdropteroate synthetase, trong khi TMP ức chế reductase dihydrofolate (Mascaretti, 2003). Khả năng kháng của *Salmonella* với sulfonamide là do gen *sul*. Các gen *sul*1*, sul*2 và *sul*3 là ba gen chính đã được xác định, trong đó, gen *sul*1 phổ biến nhất, được tìm thấy ở đa số các serovar như *Salmonella* Enteritidis*, Salmonella* Hadar*, Salmonella* Heidelberg*, Salmonella* Orion*, Salmonella* Rissen, *Salmonella* Agona*, Salmonella* Albany*, Salmonella* Derby, *Salmonella* Djugu và *Salmonella* Typhimurium. Gen *sul*1 nằm trên các yếu tố di truyền chuyển vị, chẳng hạn như integron nhóm 1 hoặc nằm trên plasmid, gen *sul*2 nằm trên plasmid. Một số gen kháng kháng sinh nhóm này đã được tìm thấy là *dhfr* và *dfr*. Những gen này có vị trí gần với *sul*1 và *sul*3 trong một integron, nằm trên plasmid hoặc nằm trên các GI của hệ gen ở *Salmonella* (Antunes và ctv, 2006).

1.13 Tình hình nghiên cứu gen kháng kháng sinh của *Salmonella* spp.

Ở nghiên cứu của Thong và Modarressi (2011) có 88 mẫu dương tính với *Salmonella* và đã phát hiện được 10 trong số 17 gen kháng kháng sinh bằng phản ứng PCR gồm các gen sau: *bla*TEM, *str*A, *str*B, *aad*A, *sul*I, *sul*II, *tet*A, *tet*B, *flo*R và *cml*A. Adesiji và ctv (2014) nhận thấy cả 20 chủng kháng TE đều mang gen *tet*A chiếm 100%, các gen *tet*B, *tet*C và *tet*G lần lượt là 30%, 35% và 50%. Trong 18 chủng kháng SXT phát hiện thấy các gen *sul*1, *sul*2 và *sul*3 với tỷ lệ lần lượt là 18 (100%), 14 (77,8%) và 4 (22,2%). Có 6 chủng kháng với C nhưng lại có tới 10 trong số 14 chủng đa kháng dương tính với gen *flo*R và *cat*2, trong khi dương tính với gen *cat*3 là 2 chủng (30%). Trong 14 chủng đa kháng được kiểm tra có 8 chủng (61%) mang gen *cml*A và 9 chủng (69%) mang gen *cml*B. Thai và Yamaguchi (2012), cũng đã tìm thấy 14/17 gen kháng kháng sinh (*bla*TEM, *bla*OXA-1, *bla*PSE1, *aad*Al, *sul*l, *tet*A, *tet*B, *tet*G, *cml*Al, *flo*R, *dfr*Al, *dfr*A12, *aac*(3)-IV và *aph*Al-1AB). Ở hầu hết các trường hợp, các gen kháng xuất hiện trong các kiểu hình kháng tương ứng. Tuy nhiên, khả năng kháng thấp với nhóm fluoroquinolone (NOR, CIP) và cephalosporins thế

hệ 3. Gen *pmr*B và *pmr*A mã hóa một hệ thống hai thành phần với một bộ cảm biến histidine kinase (*pmr*B) và bộ điều tiết tương ứng của nó (*pmr*A), một khi được phosphoryl hóa, kích hoạt sự biểu hiện gen *pmr* (Gunn và ctv, 1998). Theo Roland và ctv (1993) hai gen *pmr*A và *pmr*B cho thấy nó tạo thành một hệ thống điều hòa hai thành phần chịu trách nhiệm cho sự kháng colistin ở *Salmonella*. Điều đó giải thích tại sao các chủng *Salmonella* có sự hiện diện của gen *prm*A nhưng lại không biểu hiện kiểu hình kháng với colistin.

Hiện nay, các kháng sinh nhóm β-lactam là những kháng sinh được sử dụng nhiều nhất trong nhân y và thú y. Các kháng sinh β-lactam và quinolone thuộc nhóm các kháng sinh tối quan trọng dùng cho người (WHO, 2017). Nghiên cứu của Lê Văn Du và ctv (2017) được thực hiện trên các chủng *Salmonella* để kiểm tra sự hiện diện một số gen kháng nhóm β-lactam (*bla*TEM, *bla*SHV và *bla*OXA) và một số gen kháng quinolone nằm trên plasmid-PMQR (*qnr*A, *qnr*B và *qnr*S). Trong số các gen *bla* kiểm tra mã hóa các β-lactamase TEM, SHV và OXA chỉ có gen *bla*TEM được phát hiện. Tương tự, trong số các PMQR gen chỉ có *qnr*S được phát hiện. Kết quả cho thấy tỉ lệ *Salmonella* mang gen kháng khá cao. Có 87,18% vi khuẩn có mang gen kháng và 53,85% có cả hai nhóm gen *bla*TEM và *qnr*S. Các *Salmonella* mang gen kháng được phân lập từ các mẫu thịt có nguồn gốc rãi rác tại các tỉnh Đồng Nai, Long An, Tiền Giang và thành phố Hồ Chí Minh.

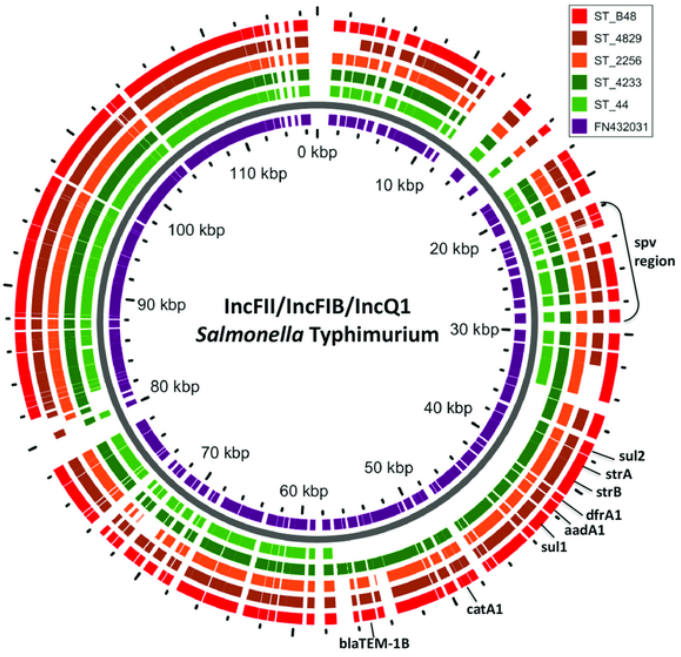
Tác giả Hoàng Hoài Phương và ctv (2008) đã phát hiện 7 gen kháng trên 11 chủng *Salmonella* spp. đa kháng có tỷ lệ cao của *bla*TEM (90,9%), *sul*2 (72,7%), *tet*A, *tet*B, và *sul*1 cùng là 63,6%, gen được phát hiện ít hơn là *clm*A (45,5%) và *bla*SHV (18,2%). Nguyễn Thị Hoài Thu và ctv (2017) cho thấy hai chủng *Salmonella* S181 và S361 có kiểu hình nhạy với GN, chủng S181 nhạy với SXT nhưng lại tìm thấy gen kháng, điều này có thể giải thích dựa theo Alberts và ctv (2004) cho rằng có khả năng gen này không được biểu hiện vào thời điểm phân tích và cảnh báo trong tương lai gần các chủng này có tiềm năng kháng lại các kháng sinh đó (Biffi và ctv, 2014). Cũng chính tác giả này còn cho biết mức độ biểu hiện của các gen *aad*A, *avr*A, *gyr*B, *prm*A, *sul*2 ở 3 mẫu *Salmonella* khảo sát là ngang nhau, không có sự khác biệt

giữa các mẫu. Sự biểu hiện của 5 gen kể trên đều chiếm tỷ lệ cao trên 65%. Trong đó, sự biểu hiện mạnh nhất là gen kháng STR (*avr*A), trung bình khoảng 80,50%, fluoroquinolones (*gyr*B) là 80,45%, sulfonamides (*sul*2) là 79,39%. Ba chủng *Salmonella* phân lập từ thịt heo tươi bán lẻ ở Hà Nội có tỷ lệ kháng cao với nhiều loại kháng sinh và kiểm tra thấy có biểu hiện của cả 7 gen đại diện cho 7 kiểu hình kháng, đó là STR (*avr*A), GN (*aad*A), β-lactam (*bla*TEM/TEM), TE (*tet*A),...

1.14 Yếu tố di truyền di động

1.14.1 Plasmid

Plasmid là các phân tử DNA mạch đôi, dạng vòng, nằm ngoài DNA nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Chúng có thể tự nhân lên độc lập với tế bào chủ do có vị trí khởi đầu sao chép ori. Các plasmid thường có kích thước từ vài đến vài trăm kbp (Leplae và ctv, 2004; Frost và ctv, 2005). Trong 1 tế bào vi khuẩn có thể có từ 1 đến nhiều loại plasmid khác nhau và mỗi loại có thể có nhiều bản sao trong tế bào. Nhìn chung, các plasmid đóng vai trò quan trọng đến việc phát tán của các gen kháng kháng sinh do chúng mang và trên plasmid có chứa gen *tra* giúp cho plasmid có thể di chuyển từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác trong cùng 1 loài hoặc khác loài với nhau.



Hình 1.3. Số lượng các gen kháng kháng sinh trên plasmid của *Salmonella* Typhimurium (Kudirkiene và ctv, 2018)

Tuy nhiên, ngày nay các plasmid được xem là nhân tố quan trọng gây nên hiện tượng đa kháng ở vi khuẩn do chúng mang các gen mã hóa cho việc kháng lại nhiều loại kháng sinh như β-lactam, macrolide, aminoglycoside, tetracycline, phenicol và SXT (Nikaido, 2009). Các plasmid mạch vòng thường được tìm hiểu nhiều hơn các plasmid mạch hở. Tuy nhiên, ngày nay, các plasmid mạch hở bắt đầu được nghiên cứu đặc tính chuyên sâu do chúng cho có khả năng chuyên chở các kiểu hình tích cực cho vật chủ. Cũng giống như plasmid mạch vòng, plasmid mạch hở cũng có khả năng tiếp hợp (Chaconas và ctv, 2010). Một số plasmid kháng kháng sinh không thể cùng tồn tại trong tế bào vật chủ. Thực tế này cho thấy chúng cũng được chia thành các nhóm không tương hợp (Couturier và ctv, 1988). Các nhà khoa học đã chia chúng thành bốn nhóm chính dựa trên cấu trúc DNA: nhóm *Inc*F (bao gồm *Inc*C, *Inc*D, *Inc*F, *Inc*J, DNA *Inc*S), nhóm *Inc*I (bao gồm *Inc*B, *Inc*I, DNA *Inc*K), nhóm *Inc*P (bao gồm *Inc*M, *Inc*P, *Inc*U, DNA *Inc*W) và DNA Ti. Thêm vào đó, các plasmid ngoài việc chứa các gen kháng kháng sinh mục tiêu còn chứa các yếu tố kháng kháng sinh qua trung gian plasmid khác như kháng quinolone (*Qnr*A và *Qnr*B) và aminoglycoside (*rmt*B) (Endimiani và Hujer, 2008).

1.14.2 Integron

Stokes và Hall (1989) lần đầu tiên đã phát hiện và mô tả các yếu tố di truyền di động, được gọi là integron có khả năng thu nhận gen ở nhiều loài vi khuẩn. Integron có khả năng nhận biết, bắt giữ 1 hay nhiều vùng gen cassette thường là chứa các gen mã hóa kháng kháng sinh (Cambray và ctv, 2010). Do integron có khả năng thu giữ 1 hay nhiều gen cassette, các vi khuẩn mang integron thường có hiện tượng đa kháng (Collis và Hall, 1995). Integron thường hiện diện phổ biến ở vi khuẩn Gram âm, đặc biệt là ở các loài vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* (White và ctv, 2001). Cấu trúc chung của các integron bao gồm 1 vùng chức năng bảo tồn 5'CS: mang các thành phần cần thiết cho hệ thống hoạt động và 1 vùng biến đổi chứa nhiều gen cassette mã hóa tính kháng kháng sinh. Vùng chức năng của integron gồm có 3 vị trí quan trọng: vị trí mang gen tổng hợp enzyme tyrosine recombinase (*IntI* gen) có chức năng xúc tác quá trình cắt và định hướng sự gắn vào integron của các gen cassette (Stokes và

Hall, 1989), điểm gắn vào của gen cassette ở 1 vị trí chuyên biệt được gọi là *att*I (Collis và ctv, 1993) và 1 promotor (Pc). Integron bản thân chúng không thể di chuyển nhưng chúng thường gắn với các yếu tố di truyền di động khác như các gen nhảy hoặc các plasmid tiếp hợp, nhờ đó mà chúng có thể phát tán gen kháng trong cùng 1 loài và giữa các loài với nhau (Davies và Davies, 2010).

Hiện nay, các nhà khoa học đã phát hiện có khoảng 10 nhóm integron (Correia và ctv, 2003), trong đó integron nhóm 1 và nhóm 2 xuất hiện phổ biến nhất ở các vi khuẩn có kiểu hình đa kháng và thường được quan tâm nhất do khả năng bắt giữ và phát tán các gen kháng của chúng trong cùng loài hay khác loài vi khuẩn với nhau (White và ctv, 2001). Bên cạnh đó, từ trước đến nay trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về sự hiện diện của integron nhưng chủ yếu là ở vi khuẩn gây bệnh trên người, gia súc, gia cầm hoặc trong môi trường (Yang và ctv, 2010) còn trên động vật thủy sản và thực phẩm thì còn hạn chế. Qua nhiều kết quả trên cho thấy, tần số xuất hiện của các integron ở một loài vi khuẩn trên các đối tượng khác nhau thì khác nhau và sự hiện diện của integron thì cũng không giống nhau ở các loài vi khuẩn (Quách Văn Cao Thi và ctv, 2015). Đa số integron được chia làm 2 loại: loại liên kết với các yếu tố di truyền di động như gen nhảy hoặc các plasmid tiếp hợp, gọi là integron di động và loại nằm trên nhiễm sắc thể, gọi là integron nhiễm sắc thể. Integron nhiễm sắc thể thường không liên quan đến kiểu hình kháng của vi khuẩn (Cambray và ctv, 2010). Integron di động được chia thành nhiều nhóm khác nhau dựa trên trình tự axit amin của các gen integrase tương ứng, các gen này thường tương đồng từ 45-58% (Rowe-Magmus và Mzael, 2002). Cho đến nay, các nhà khoa học trên thế giới đã phát hiện được ít nhất 5 nhóm integron di động, trong số đó thì integron nhóm 1 và nhóm 2 là những integron hiện diện phổ biến ở các vi khuẩn có kiểu hình đa kháng và chúng thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học do có khả năng phát tán các gen kháng có thể xảy ra trong cùng 1 loài và giữa các loài với nhau (White và ctv, 2001).

1.14.2.1 Integron nhóm 1

Cấu trúc chung của các integron nhóm 1 gồm vùng 5’-CS và 3’-CS bị chia cắt bởi vùng biến đổi chứa 1 hoặc nhiều gen cassette (Rodríguez và ctv, 2006). Vùng 5’-

CS là vùng chức năng chứa gen integrase (*intI*1), điểm tiếp hợp (*attI*1) và 1 promoter (Pc) cho phép gen cassette gắn vào *attI*1 ở 1 hướng thích hợp. Vùng 3'-CS của các integron nhóm 1 bao gồm gen *qacEΔ*1 mã hóa tính kháng đối với các hợp chất ammonia bậc 4 và gen *sul*1 mã hóa gen kháng nhóm sulfonamide và 2 khung đọc mở: orf5 và orf6 (Partridge và ctv, 2009). Các integron nhóm 1 thường hiện diện phổ biến ở vi khuẩn đa kháng và được phát hiện ở nhiều loài vi khuẩn Gram âm như *Acinetobacter, Aeromonas, Alcaligenes, Burkholderia, Campylobacter, Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, Shigella* và *Vibrio* (Fluit và Schmitz, 2004). Công bố của Kang và ctv (2005) cho thấy, sự hiện diện của integron nhóm 1 ở các *Salmonella* từ động vật thì nhiều hơn từ người. Nhìn chung, integron nhóm 1 thì hiện diện phổ biến nhất ở các vi khuẩn đa kháng (White và ctv, 2001; Cambray và ctv, 2010). Ngoài ra, sự hiện diện của chúng có thể góp phần đáng kể vào việc chuyển gen ngang của các gen kháng giữa các loài vi khuẩn từ các nguồn hoặc các vùng địa lý khác nhau.

1.14.2.2 Integron nhóm 2

Integron nhóm 2 thường liên kết với tranposon Tn7 (Collis và Hall, 1995). Integron nhóm 2 không chứa gen *sul*1 nhưng nó chứa các gen có vai trò thúc đẩy sự chuyển vị của Tn7 (Recchia và Hall, 1995). Theo Hansson và ctv (2002) thì gen integrase của integron nhóm 2 (*IntI2)* có tỷ lệ tương đồng với gen integrase của integron nhóm 1 là 46%. Integron 2 thường xuất hiện ở các vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae*, đặc biệt là *E. coli* (White và ctv, 2001; Machado và ctv, 2006). Integron nhóm 2 thường chứa các gen *ere*A (kháng với erythromycin); *cat*B2 (kháng C), *aad*B (kháng GN, TOB và K), *dfr* (kháng TMP), *sat* (kháng streptothrycin) và *estX* (mã hóa cho esterase giả định) (Partridge và ctv, 2009).

1.14.2.3 Integron nhóm 3, 4 và 5

Ngoài integron nhóm 1 và 2 thì nhóm 3, 4 và 5 cũng được phát hiện ở vi khuẩn. Tuy nhiên, chỉ 1 số ít các nghiên cứu về integron nhóm này được báo cáo. Integron nhóm 3 lần đầu tiên được phát hiện bởi Arakawa và ctv (1995) từ các chủng *Serratia*

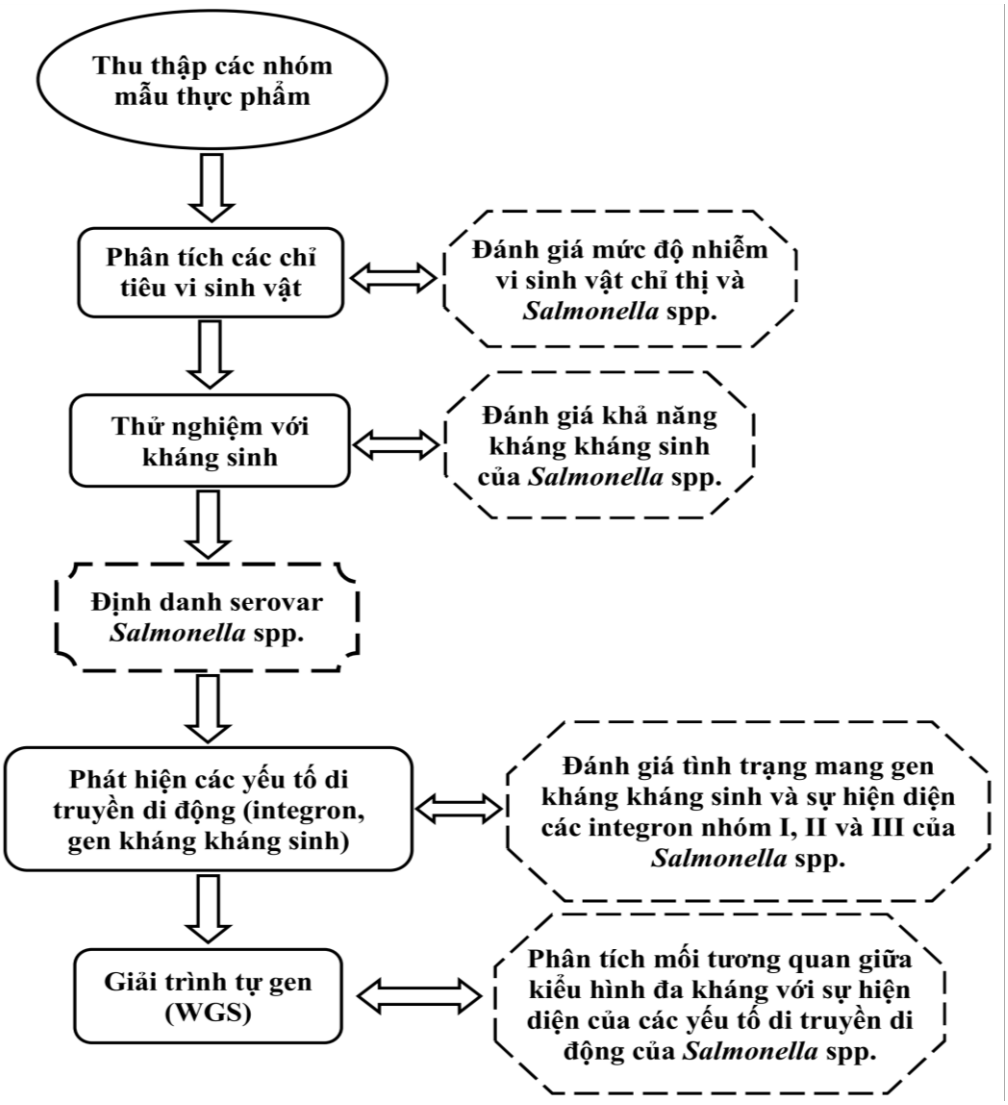
marcescens kháng carbapenem. Trong khi, integron nhóm 4 và 5 đã được báo cáo từ 1 số loài *Vibrio* kháng với TMP (Hochhut và ctv, 2001; Cambray và ctv, 2010).

1.14.3 Gen cassette

Gen cassette là những yếu tố di truyền di động nhỏ nhất và không có khả năng sao chép, thường chỉ chứa 1 gen đơn và 1 điểm tái tổ hợp (attC) hay còn gọi là 59-be (Labbate và ctv, 2009). Hầu hết các gen cassette không có promoter nên hoạt động của chúng phụ thuộc vào promoter của integron mà chúng chèn vào (Cambray và ctv, 2010). Do đó, nó không thể tự nhân đôi ở trạng thái tự do. Nhiều gen cassette có thể chèn vào cùng 1 integron nên gây ra hiện tượng đa kháng (Partridge và ctv, 2009).

Tổng hợp báo cáo từ các nhà khoa học thì có hơn 130 gen cassette khác nhau đã được xác định (Fluit và Schmitz, 2004; Partridge và ctv, 2009). Trong đó, có hơn 80 gen cassette khác nhau từ integron nhóm 1 đã được phát hiện và chúng thường mã hóa cho sự kháng với các kháng sinh như aminoglycoside, chloramphenicol, trimethoprim, streptothricin, rifampin, erythromycin, fosfomycin, lincomycin, các hợp chất amino bậc 4 và các kháng sinh thuộc nhóm β–lactam (Rowe-Magmus và Mazel, 2002; Fluit và Schmitz, 2004).

CHƯƠNG 2
PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU



Hình 2.1. Tóm tắt sơ đồ nghiên cứu

2.1 Vật liệu

2.1.1 Nguyên liệu

Các chủng *Salmonella* spp. được phân lập từ bốn nhóm thực phẩm và sản phẩm chế biến như: thịt, trứng, thủy sản, rau củ quả (Phụ lục A1).

2.1.2 Môi trường nuôi cấy, hóa chất, thuốc thử dùng phân lập *Salmonella* spp.

Tất cả các môi trường nuôi cấy, hóa chất, thuốc thử được sử dụng để phân lập và định danh *Salmonella* spp. theo quy trình ISO 6579-1:2017 đều được vô trùng và

điều chỉnh pH trước khi dùng. Thành phần và số lượng các loại môi trường nuôi cấy, hóa chất, thuốc thử được trình bày trong phụ lục A2.

2.1.3 Môi trường dùng khảo sát tính nhạy với kháng sinh của *Salmonella* spp.

Môi trường canh thang BHI (Merck, Đức); thạch Mueller Hinton (Oxoid, Anh). Thành phần được trình bày trong phụ lục A3. Khoanh giấy kháng sinh sử dụng xác định tính nhạy đối với kháng sinh của *Salmonella* spp. được cung cấp bởi hãng Bioanalyse, Thổ Nhĩ Kỳ. Các kháng sinh được lựa chọn theo hướng dẫn của CLSI 2018. Danh sách khoanh giấy kháng sinh được trình bày trong Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Danh sách khoanh giấy kháng sinh

STT	Nhóm kháng sinh		Tên kháng sinh	Hàm lượng (µg)
1	β-Lactam	Penicilin	Amoxicillin/ Clavunic acid (AMC)	20/10
2			Ampicillin (AMP)	10
3		Cephalosporin	Ceftazidime (CAZ)	30
4	Phenicol		Chloramphenicol (C)	30
5	Quinolon		Nalidixic acid (NA)	30
6			Ciprofloxacin (CIP)	5
7			Ofloxacin (OFX)	5
8	Aminoglycoside		Gentamycin (GM)	10
9			Streptomycin (STR)	10
10	Tetracycline		Tetracycline (TE)	30
11	Sulfonamide		Sulfamethoxazole/ Trimethoprim (SXT)	1,25/23,75

2.1.4 Hóa chất sinh học phân tử

Hóa chất dùng để ly trích và tinh sạch DNA vi khuẩn: Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride (Tris–HCl, Biorad, Pháp), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma, Mỹ), sodium dodecyl sulfate (SDS, Merck, Đức), isoamylalcohol (Merck, Đức), ethanol (Merck, Đức), chloroform (Merck, Đức), cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB, Biorad, Pháp), proteinase K (Fermentas, Mỹ), dung dịch đệm PBS, TE (Sigma-Aldrich, Singapore), bộ kit AccuRive pDNA Prep Kit (KT Biotech); bộ kit Genomic DNA Purification Kit (Norgen Biotek, Canada).

Hóa chất dùng để trích DNA plasmid vi khuẩn: bộ kít trích plasmid vi khuẩn: PrimePrep Plasmid DNA Isolation Kit (GeNet Bio, Hàn Quốc).

Hóa chất dùng để thực hiện phản ứng PCR: Master Mix PCR (iProof HF Master Mix, Bio-rad, Pháp), Taq DNApolymerase (iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase, Bio-rad, Pháp).

Hóa chất điện di sản phẩm PCR: agarose (Bio-rad, Pháp), Tris-borateacetate-EDTA (5X TBE Buffer: Tris base (0,445 M), boric acid (0,445 M) và EDTA (12,5 mM) (Sigma-Aldrich, Singapore), loading dye/loading buffer (Bio-rad, Pháp), SafeView (Merck, Đức), các thang chuẩn DNA gồm 100 bp, 100 bp plus, 1 kbp (Fermentas, Mỹ) dùng để xác định kích thước các sản phẩm PCR.

Trình tự các cặp mồi dùng để xác định các integron nhóm 1, 2 và 3; các vùng gen cassette, các plasmid; các gen kháng kháng sinh được tham khảo từ các nghiên cứu đã công bố và tổng hợp, cung cấp bởi Sigma-Aldrich, Singapore.

2.1.5 Chủng chuẩn vi sinh vật dùng làm kiểm soát

Escherichia coli ATCC 25922; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi ATCC 13428; *Salmonella enterica* sups. serovar Kentucky SA12/19 1600; *Salmonella enterica* sups. serovar Kentucky SA11/19 3497; *Salmonella enterica* sups. serovar Kentucky SA07/20 1066; *Salmonella enterica* sups. serovar Kentucky SA07/20 1067; Hỗn hợp dịch DNA chuẩn (*bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-2, *bla*CTX-M-8/25, *bla*CTXM-9, *bla*TEM và blaSHV) được cung cấp bởi Viện Y tế Công cộng thành phố Hồ Chí Minh.

2.1.6 Thiết bị

Các thiết bị được sử dụng trong luận án này: Tủ ấm (Memmert, Đức); Tủ an toàn sinh học (Esco, Singapore); Tủ sấy (Memmert, Đức); Nồi hấp (Hirayama, Nhật); Cân phân tích (Sartorious, Đức); Máy đo pH (Mettler Toledo, Thụy Sĩ); Máy lọc nước (Elga, Anh); Máy đồng nhất mẫu (Seward, Anh); Kính hiển vi (Olympus, Nhật); Tủ âm sâu (Eppendorf, Đức); Máy Realtime PCR ABI (Thermo Scientific/Mỹ); Máy PCR (Eppendorf/Đức); Máy ủ lắc nhiệt (Eppendorf, Đức); Hệ thống chụp ảnh Gel (Syngene, Anh); Máy ly tâm lạnh (Hettich, Đức); Máy định lượng DNA/RNA (Eppendorf, Đức); Bộ điện di ngang (IBI/Mỹ);...

2.2 Phương pháp

2.2.1 Phương pháp xác định cỡ mẫu

Trong luận án này chúng tôi tiến hành tính toán cỡ mẫu cho từng đối tượng và chọn cỡ mẫu nghiên cứu lớn nhất làm cỡ mẫu chung cho các thí nghiệm. Vì thế chúng tôi áp dụng công thức ước tính cỡ mẫu như sau:

$$n = \frac{z^2(p.q)}{e^2}$$

Trong đó: z là giá trị phân phối tương ứng với độ tin cậy 95% thì giá trị z là 1,96; p là tỷ lệ % ước tính của thực phẩm không đạt chỉ tiêu vi sinh của một nghiên cứu trước đó, p=0,4 (với tỷ lệ thực phẩm không đạt chỉ tiêu vi sinh là 43,75%) (Lê Văn Du và Hồ Thị Kim Hoa, 2017); e: mức chính xác mong muốn là 0,05. Cỡ mẫu cần thu thập phải lớn hơn hoặc bằng 376 mẫu.

2.2.2 Phương pháp lấy và bảo quản mẫu

Lượng mẫu lấy theo hướng dẫn chung về lấy mẫu thực phẩm phục vụ thanh tra, kiểm tra chất lượng, vệ sinh an toàn thực phẩm (thông tư 14/2011/TT-BYT). Mẫu được thu thập ngẫu nhiên vào khoảng thời gian từ 08 đến 09 giờ sáng, mỗi lần lấy cùng lúc bốn nhóm (thịt, thủy hải sản, trứng và rau củ quả) tại một chợ bán lẻ ở vị trí trung tâm trên địa bàn thành phố thành phố Hồ Chí Minh đã được xác định trước. Tên các mẫu được mã hóa riêng, ghi nhận thông tin như người thực hiện, số lượng, thời gian và địa điểm lấy mẫu. Tất cả các mẫu chuyển đến phòng thí nghiệm trong vòng 04 giờ sau khi lấy và tiến hành phân tích ngay.

2.3 Phương pháp phân lập *Salmonella* spp.

Các mẫu thực phẩm sau khi được phát hiện *Salmonella* bằng kỹ thuật PCR, tiếp tục tiến hành phân lập thu nhận khuẩn lạc theo ISO 6579-1:2017 để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

2.3.1 Chuẩn bị mẫu thử và huyền phù ban đầu

Đồng nhất 25g mẫu với 225mL BPW (Merck, Đức) thu nhận dịch tăng sinh.

2.3.2 Tăng sinh sơ bộ không chọn lọc

Ủ huyền phù ban đầu ở nhiệt độ từ 34^{o}C đến 38^{o}C trong (18±2) giờ.

2.3.3 Tăng sinh chọn lọc

Chuyển 0,1mL dịch cấy tăng sinh vào ống chứa 10mL RSV (Merck, Đức). Tiếp tục, 1mL vào ống có chứa 10mL MKTTn (Merck, Đức). Ủ canh thang RVS ở 41,5°C trong (24±3) giờ và MKTTn ở 37°C trong (24±3) giờ.

2.3.4 Phân lập

Từ dịch cấy thu được trong canh thang RVS và MKTTn, cấy một vòng 10µl lên bề mặt đĩa thạch XLD (Merck, Đức) và đĩa thạch chọn lọc thứ hai BPLS (Merck, Đức). Lật úp các đĩa ủ ở 37°C trong (24±3) giờ. Các khuẩn lạc *Salmonella* spp. điển hình phát triển trên thạch XLD có tâm màu đen và vùng ngoài có màu đỏ nhạt trong suốt. Khuẩn lạc điển hình trên thạch BPLS có màu hồng trong được bao quanh vùng màu đỏ có thể coi là *Salmonella* giả định.

2.3.5 Khẳng định

Chọn ít nhất một khuẩn lạc điển hình hoặc nghi ngờ để cấy truyền và khẳng định. Nếu khuẩn lạc này âm tính thì chọn nhiều hơn bốn khuẩn lạc nghi ngờ để chắc chắn rằng các khuẩn lạc này đã được cấy truyền trên hỗn hợp các môi trường phân lập và môi trường tăng sinh chọn lọc khác nhau. Cấy ria các khuẩn lạc được chọn trên bề mặt môi trường thạch không chọn lọc đã được làm khô trước. Ủ các đĩa đã cấy ở nhiệt độ từ 34°C đến 38°C trong (24±3) giờ. Tiếp tục cấy các khuẩn lạc đã được làm thuần sang các môi trường sinh hóa và diễn giải kết quả theo phụ lục A4 và A5.

Kiểm tra các chủng tự ngưng kết: Cho một giọt dung dịch nước muối lên lam kính thủy tinh sạch. Dùng que cấy vòng trộn đều dung dịch nước muối với khuẩn lạc cần thử nghiệm, để thu được huyền phù đục và đồng nhất. Lắc nhẹ lam kính từ 5 giây đến 60 giây. Quan sát huyền phù trên nền màu đen. Nếu các vi khuẩn kết dính thành hạt trong huyền phù thì chủng này được xem là tự ngưng kết.

Kiểm tra các kháng nguyên O và H: Kiểm tra sự có mặt của kháng nguyên O với khuẩn lạc thuần đã xác định không có khả năng tự ngưng kết, tiến hành theo cách kiểm tra tự ngưng kết, sử dụng một giọt huyết thanh kháng nguyên O và H đa giá thay cho dung dịch nước muối. Nếu xuất hiện ngưng kết thì phản ứng được xem là dương tính. Diễn giải kết quả kháng huyết thanh theo phụ lục A6.

2.4 Phương pháp xác định serovar của *Salmonella* spp.

Việc phát hiện sự có mặt của kháng nguyên O, kháng nguyên H của *Salmonella* được thực hiện bằng sự ngưng kết trên phiến kính với huyết thanh thích hợp từ các khuẩn lạc thuần khiết và sau khi các chủng có thể tự ngưng kết đã bị loại trừ được thực hiện theo ISO/TR 6579-3:2014.

Kiểm tra kháng nguyên O: Sử dụng một khuẩn lạc thuần không tự ngưng kết, hòa với một giọt huyết thanh kháng nguyên O trên phiến kính. Lắc nhẹ phiến kính từ 30 giây đến 60 giây. Nếu xuất hiện ngưng kết, thì phản ứng được xem là dương tính. Tiến hành với các nhóm OMA, OMB, OMC,... tương tự kháng huyết thanh poly O. Với nhóm cho phản ứng dương tính, tiếp tục với các kháng huyết thanh O đơn giá.

Kiểm tra kháng nguyên H: Cấy khuẩn lạc thuần không tự ngưng kết vào thạch dinh dưỡng nửa đặc, ủ ở 37^{o}C trong 24 ± 3 giờ. Sử dụng một khuẩn lạc thuần không tự ngưng kết, hòa với một giọt huyết thanh kháng nguyên H trên phiến kính. Lắc nhẹ phiến kính từ 30 giây đến 60 giây. Nếu xuất hiện ngưng kết, thì phản ứng được xem là dương tính. Nhiều chủng *Salmonella* có 2 pha kháng nguyên H. Tuy nhiên ở vi khuẩn *Salmonella* đã nuôi cấy thường chỉ xuất hiện 1 pha. Pha 2 được phát hiện khi ức chế sự xuất hiện của pha 1 bằng cách nhỏ 1 giọt kháng huyết thanh ức chế pha 1 vào đĩa thạch Sven Gard. Cách tiến hành như sau:

Pha 1: Tiến hành với kháng huyết thanh đa giá poly H, kháng huyết thanh nhóm H (HMA, HMB, HMC), kháng huyết thanh đơn giá H.

Pha 2: Chuẩn bị thạch Sven Gard: Đây là môi trường bán sẵn trên thị trường, pha theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trước khi đổ thạch nhỏ 1 giọt nhỏ Anti Sven Gard Serum với mục đích ức chế pha 1. Tuỳ theo pha 1 mà có loại Anti Sven Gard Serum khác nhau (SG1, SG2, SG3, SG4, SG5, SG6).

Dùng que cấy vô trùng lấy một ít vi khuẩn đã xác định được kháng nguyên H pha 1, chấm nhẹ lên bề mặt thạch ở vị trí giữa đĩa thạch Sven gard, ủ ở 37^{o}C trong 24 giờ. Tiến hành phản ứng ngưng kết trên phiến kính tương tự như pha 1. Quy trình xác định typ huyết thanh chủng phân lập *Salmonella* spp. bằng cách ngưng kết với các kháng huyết thanh OMA và OMB đa giá được trình bày phụ lục A7.

Các chủng được xem là *Salmonella* được gửi đến Viện Y tế Công cộng thành phố Hồ Chí Minh để khẳng định.

2.5 Khảo sát tính nhạy với kháng sinh của *Salmonella* spp.

2.5.1 Lựa chọn kháng sinh thử nghiệm

Thử nghiệm xác định khả năng kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp. được thực hiện trên các loại kháng sinh thường được sử dụng trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy hải sản cụ thể: nhóm β-Lactam: Penicilin (Ampicillin, Amoxicillin/Clavunic acid); Cephalosporin (Ceftazidime); Nhóm Phenicol (Chloramphenicol); Nhóm Quinolon (Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Ofloxacin); Nhóm Aminoglycosid (Gentamycin, Streptomycin); Nhóm Tetracycline (Tetracycline); Nhóm Sulfonamide (sulfamethoxazole/trimethoprim).

2.5.2 Phương pháp xác định tính nhạy với kháng sinh của *Salmonella* spp

Sử dụng phương pháp của Kirby-Bauer và đánh giá khả năng nhạy với kháng sinh của *Salmonella* spp. dựa vào tiêu chí đánh giá được đề xuất từ Viện tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm (CLSI, 2018) (Phụ lục A8).

Các chủng *Salmonella* được tăng sinh trong môi trường BHI (Merck, Đức) ở 37^{o}C trong 18-24 giờ. Hỗn dịch *Salmonella* sau đó được cấy sang thạch NA (Merck, Đức) đã được chuẩn bị và ủ ở 37^{o}C trong 18-24 giờ để thu nhận khuẩn lạc. Hòa tan khuẩn lạc thu được vào dung dịch pha loãng MRD (Merck, Đức) để tiến hành đo độ đục. Huyền phù *Salmonella* có độ đục 0,5 McFarland được sử dụng để ria lên đĩa thạch bằng tăm bông, để khô tự nhiên và đặt các khoanh giấy kháng sinh lên bề mặt thạch Mueller-Hinton, ủ ở 37^{o}C trong 16-18 giờ. Đo đường kính vòng vô khuẩn và đánh giá khả năng nhạy của *Salmonella* với từng loại kháng sinh dựa vào hướng dẫn của CLSI, 2018. Thử nghiệm đánh giá khả năng kháng kháng sinh được thực hiện tại Phòng Vi sinh, Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm TP. HCM.

2.6 Ly trích DNA của *Salmonella* spp.

Dùng micropipet hút 0,5mL dịch huyền phù BPW (Merck, Đức) hoặc que cấy tròn lấy một vòng khuẩn lạc từ môi trường thạch dinh dưỡng Nutrient Agar (Merck,

Đức) cho vào ống ly tâm 1,5mL có chứa 1mL nước vô trùng. Quy trình ly trích, tinh sạch DNA theo hướng dẫn của bộ kit Genet Bio (Hàn Quốc).

2.7 Phương pháp phát hiện *Salmonella* spp. bằng kỹ thuật PCR

Mục tiêu: xác định tỷ lệ mẫu dương tính với *Salmonella* spp. trên các nhóm thực phẩm khảo sát bằng phản ứng s-PCR1.

Xác định sự hiện diện của *Salmonella* spp. trong mẫu tham khảo TCVN 4832:2012 bằng cách sử dụng cặp mồi *inv*A. Trình tự cặp mồi và kích cỡ sản phẩm khuếch đại được trình bày ở Bảng 2.3.

2.8 Phương pháp nghiên cứu đặc điểm phân tử liên quan đến sự đa kháng của *Salmonella*

2.8.1 Khảo sát sự hiện diện plasmid không tương hợp của các chủng *Salmonella*

Mục tiêu: Xác định sự hiện diện 18 loại plasmid không tương hợp phổ biến trên các chủng *Salmonella* dựa vào 5 phản ứng multiplex-PCR và 3 simplex-PCR. Trình tự mồi được thiết kế đặc hiệu cho các replicon của plasmid dựa theo Carattoli và ctv (2005) và kích cỡ sản phẩm khuếch đại được trình bày Bảng 2.2.

Phản ứng m-PCR 1: Gồm các cặp mồi HI1, HI2, I1

Phản ứng m-PCR 2: Gồm các cặp mồi X, L/M, N

Phản ứng m-PCR 3: Gồm các cặp mồi FIA, FIB, W

Phản ứng m-PCR 4: Gồm các cặp mồi Y, P, FIC

Phản ứng m-PCR 5: Gồm các cặp mồi A/C, T, FIIA

Phản ứng s-PCR 2, 3, 4: Gồm các cặp mồi F, K/B, B/O

2.8.2 Khảo sát sự hiện diện của các nhóm integron và vùng gen cassette

Mục tiêu: Đối với các serovar *Salmonella* đa kháng phân lập từ thực phẩm xác định sự hiện diện các nhóm integron (Asgharpour và ctv, 2018) dựa vào phản ứng m-PCR 6 và vùng gen cassette (Kaushik và ctv, 2019) bằng phản ứng s-PCR 5, 6. Trình tự của các cặp mồi và kích cỡ sản phẩm khuếch đại được trình bày ở Bảng 2.3.

Phản ứng m-PCR 6: Gồm các cặp mồi *Int*1, *Int*2 và *Int*3

Phản ứng s-PCR 5, 6: Gồm các cặp mồi *5'CS/3'CS* và *hep*51/*hep*74

Bảng 2.2. Trình tự các cặp mồi khảo sát sự hiện diện plasmid

Mục tiêu	Primer	Trình tự 5'-3'	Kích thước (bp)		Nguồn
parA-parB	*HI*1 FW	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471	m-PCR 1	Carattoli và ctv, 2005
	*HI*1 RV	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA			
iterons	*HI*2 FW	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	644		
	*HI*2 RV	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			
RNAi	*I*1 FW	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139		
	*I*1 RV	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT			
ori γ	*X* FW	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376	m-PCR 2	
	X RV	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC			
repA, B, C	*L/M* FW	GGATGAAAACTATCAGCATCTGAAG	785		
	L/M RV	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			
repA	*N* FW	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559		
	N RV	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
iterons	*FIA* FW	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462	m-PCR 3	
	FIA RV	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG			
repA	*FIB* FW	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	702		
	FIB RV	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
repA	*W* FW	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	242		
	W RV	GGTGCGCGGCATAGAACCGT			
repA	*Y* FW	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	765	m-PCR 4	

	Y RV	GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT		
iterons	*P* FW	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534	
	P RV	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
repA2	*FIC* FW	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262	
	FIC RV	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		
repA	*A/C* FW	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465	
	A/C RV	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
repA	*T* FW	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750	m-PCR 5
	T RV	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC		
repA	*FIIA* FW	CTGTCGTAAGCTGATGGC	270	
	FIIA RV	CTCTGCCACAAACTTCAGC		
RNAi/repA	F_{repb} FW	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270	s-PCR 2
	F_{repb} RW	GAAGATCAGTCACACCATCC		
RNAi	*K/B* FW	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	160	s-PCR 3
	K/B R R	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA		
RNAi	*B/O* FW	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	159	s-PCR 4
	B/O RV	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA		

2.8.3 Khảo sát sự hiện diện gen kháng kháng sinh của *Salmonella* spp.

Mục tiêu: Phát hiện sự lưu hành gen mã hóa sinh ESBL thuộc nhóm *bla*TEM, *bla*SHV (Quoc và ctv, 2015) và *bla*CTX (Ghazaei, 2018); các gen *tet*A, *tet*B, *tet*C mã hóa kháng tetracyline (Guillaume và ctv, 2000); các gen *cml*A, *cml*B *và flo* mã hóa kháng C (Chen và ctv, 2004); các gen *sul*1, *sul*2 mã hóa kháng sulfamethoxazol (Chen và ctv, 2004); các gen *str*A, *str*B, *aad*A2 mã hóa kháng STR và gen *aad*B mã hóa kháng gentamycin (Doosti và ctv, 2016); các gen *gyr*A, *gyr*B mã hóa kháng NA (Eaves và ctv, 2002) và gen *par*C, *par*E mã hóa kháng CIP (Eaves và ctv, 2004). Trình tự các cặp mồi và kích cỡ sản phẩm khuếch đại trình bày ở Bảng 2.3.

Phản ứng m-PCR 7: Gồm các cặp mồi *bla*TEM, *bla*SHV và *bla*CTX

Phản ứng m-PCR 8: Gồm các cặp mồi *tet*A, *tet*B

Phản ứng m-PCR 9: Gồm các cặp mồi *cml*A, *cml*B *và flo*

Phản ứng m-PCR 10: Gồm các cặp mồi *sul*1, *sul*2

Phản ứng m-PCR 11: Gồm các cặp mồi *str*A, *str*B

Phản ứng m-PCR 12: Gồm các cặp mồi *aad*A2, *aad*B

Phản ứng m-PCR 13: Gồm các cặp mồi *gyr*A, *gyr*B

Phản ứng m-PCR 14: Gồm các cặp mồi *par*C, *par*E

Phản ứng s-PCR 7: Gồm các cặp mồi *tet*C

2.8.4 Thành phần và quy trình nhiệt của các phản ứng s-PCR

Thành phần phản ứng cho các s-PCR bao gồm: Master mix 2X; 2 UI Taq DNA Polymerase; 0,5 µl mỗi đoạn mồi (nồng độ 0,5 µM); 5 µl (50 ng) DNA khuôn mẫu và nước cất khử ion vừa đủ thể tích 25 µl.

Chu trình nhiệt cho phản ứng s-PCR 1: 95ºC/5 phút; 35 chu kỳ (95ºC/60 giây; 54ºC/45 giây và 72ºC/60 giây); 72ºC/10 phút.

Chu trình nhiệt cho phản ứng s-PCR 2-->4: 94°C/5 phút, 30 chu kỳ (94°C/60 giây; 52°C/30 giây và 72°C/60 giây); 72°C/5 phút.

Chu trình nhiệt cho phản ứng s-PCR 5: 94ºC/05 phút; 35 chu kỳ (94ºC/01 phút, 58ºC/02 phút, 72ºC/02 phút); 72ºC/10 phút.

Chu trình nhiệt cho phản ứng s-PCR 6: 94ºC/05 phút; 35 chu kỳ (94ºC/01 phút, 55ºC/01 phút, 72ºC/05 phút); 72ºC/10 phút.

Chu trình nhiệt cho phản ứng s-PCR 7: 94ºC/01 phút; 30 chu kỳ (94ºC/01 phút, 58ºC/01 phút, 72ºC/02 phút); 72ºC/10 phút.

2.8.5 Thành phần và quy trình nhiệt của các phản ứng m-PCR

Thành phần phản ứng cho các m-PCR bao gồm: Master mix 2X; 2 UI Taq DNA Polymerase; 0,5 µl mỗi đoạn mồi (nồng độ 0,5 µM); 5 µl (50 ng) DNA khuôn mẫu và nước cất khử ion vừa đủ thể tích 25 µl.

Chu trình nhiệt cho phản ứng m-PCR 1-->5: 94°C/5 phút, 30 chu kỳ (94°C/60 giây, 60°C/30 giây, 72°C/60 giây); 72°C/5phút.

Chu trình nhiệt cho phản ứng m-PCR 6: 95ºC/05 phút; 35 chu kỳ (95ºC/01 phút, 54ºC/01 phút, 72ºC/02 phút); 72ºC/10 phút.

Chu trình nhiệt cho phản ứng m-PCR 7: 95ºC/02 phút; 25 chu kỳ (95ºC/30 giây, 60ºC/90 giây, 72ºC/90 giây); 68ºC/10 phút.

Chu trình nhiệt cho phản ứng m-PCR 8: 94ºC/01 phút; 30 chu kỳ (94ºC/01 phút, 55ºC/01 phút, 72ºC/02 phút); 72ºC/10 phút.

Chu trình nhiệt cho phản ứng m-PCR 09-->10: 95ºC/10 phút; 30 chu kỳ (95ºC/30 giây, 55ºC/01 phút, 72ºC/01 phút); 72ºC/07 phút.

Chu trình nhiệt cho phản ứng m-PCR 11-->12: 95ºC/05 phút; 32 chu kỳ [(94ºC/01 phút, 61ºC/01 phút (m-PCR 12); 64ºC/01 phút (m-PCR 13), 72ºC/01 phút)]; 72ºC/05 phút.

Chu trình nhiệt cho phản ứng m-PCR 13-->14: 95ºC/10 phút; 32 chu kỳ (95ºC/01 phút, 52ºC/01 phút, 72ºC/30 giây); 72ºC/10 phút.

2.8.6 Điện di và đọc kết quả

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%, thời gian là 35-40 phút ở 100 V và 100 mA. Sau đó chụp hình gel với tia UV bằng máy chụp ảnh gel Ingenius.

2.9 Giải trình tự thế hệ mới

Giải trình tự thế hệ mới là phương pháp đo trực tiếp trình tự axit nucleic có mặt trong mẫu, do đó chỉ cần đếm số lượng của một loại trình tự có mặt trong mẫu. Số

lượng trình tự tuyến tính với nồng độ trình tự axit nucleic có mặt trong mẫu. Hơn nữa, giải trình tự thế hệ mới không phụ thuộc vào thông tin của trình tự axit nucleic có thể biểu hiện trong mẫu nghiên cứu, không phụ thuộc vào các gen có mức tương đồng cao (Wold và Myers, 2008).

Nguyên tắc của giải trình tự thế hệ mới cũng tương tự như thế hệ đầu tiên. Sự khác biệt quan trọng của giải trình tự thế hệ mới so với phương pháp cũ là tiến hành giải trình tự đồng thời hàng triệu mảnh DNA. Các bước cơ bản trong giải trình tự gen thế hệ mới bằng phương pháp tổng hợp như sau:

Tạo thư viện: DNA cần giải trình tự được tách chiết và cắt thành các mảnh nhỏ và gắn các adapter cần thiết cho quá trình giải trình tự.

Tạo cluster: mỗi sợi DNA được giữ lại trên bề mặt thiết bị giải trình tự bằng adapter đã được gắn trước đó. Mỗi sợi DNA sau khi được khuếch đại sẽ tạo thành một cụm DNA có trình tự giống hệt nhau để sử dụng cho quá trình giải trình tự.

Giải trình tự: dNTP có gắn các tín hiệu huỳnh quang tương ứng với 4 loại nucleotide, tín hiệu huỳnh quang của từng nulceotide được ghi lại trong quá trình tổng hợp theo nguyên tắc bổ sung trên sợi DNA khuôn.

Phân tích kết quả: Kết quả từ quá trình giải trình tự được phân tích tùy theo mục đích sử dụng.

Các serovar *Salmonella* trong luận án này liên quan đến cơ chế đa kháng được thực hiện giải trình tự toàn bộ hệ gen tại Công Ty TNHH Khoa Học KTEST để phân tích các nhóm gen kháng và yếu tố di truyền di động.

2.10 Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả nghiên cứu được xử lý thống kê bằng phương pháp chi bình phương và phân tích bằng phần mềm Microsoft excel 2019, SPSS 20. Thống kê mô tả và được thực hiện thông qua tính toán tần số, tỷ lệ phần trăm (đối với các số liệu định tính như tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp., tỷ lệ kháng kháng sinh, tỷ lệ xuất hiện các kiểu gen mã hóa, plasmid, integron,…).

Bảng 2.3. Trình tự các cặp mồi khảo sát sự hiện diện gen kháng kháng sinh

Mục tiêu	Primer	Trình tự 5'-3'	Kích thước (bp)	Phản ứng	Nguồn
*Inv*A	*Inv*A1	TTGTTACGGCTATTTTGACCA	520	s-PCR 1	TCVN 8342:2012
	*Inv*A2	CTGACTGCTACCTTGGCTGATG			
Integron nhóm 1	*Int*1 F	CAGTGGACATAAGCCTGTTC	164	m-PCR 6	Asgharpour và ctv, 2018
	*Int*1 R	CCCGAGGCATAGACTGTA			
Integron nhóm 2	*Int*2 F	TTATTGCTGGGATTAGGC	233		
	*Int*2 R	ACGGCTACCCTCTGTTATC			
Integron nhóm 3	*Int*3 F	AGTGGGTGGCGAATGAGTG	600		
	*Int*3 R	TGTTCTTGTATCGGCAGGTG			
Cassette integron 1	*5'CS*	GGCATCCAAGCAGCAAG	Variable*	s-PCR 5	Kaushik và ctv, 2019
	3*'CS*	AAGCAGACTTGACCTGA			
Cassette integron 2	*hep*51	GATGCCATCGCAAGTACGAG	Variable*	s-PCR 6	
	*hep*74	CGGGATCCCGGACGGCATGCAC GATTTGTA			
ESBL	*bla*TEM	GGTCGCCGCATACACTATTCTC	372	m-PCR 7	Quoc và ctv, 2015
		TTTATCCGCCTCCATCCAGTC			
	*bla*SHV	CCAGCAGGATCTGGTGGACTAC	231		
		CCGGGAAGCGCCTCAT			
	*bla*CTX	CCCATGGTTAAAAAACACTGC	950		Ghazaei, 2018
		CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG			
Tetracyline	*tet*A	GGCCTCAATTTCCTGACG	372	m-PCR 8	Guillaume và ctv, 2000
		AAGCAGGATGTAGCCTGTGC			
	*tet*B	GAGACGCAATCGAATTCGG	228		
		TTTAGTGGCTATTCTTCCTGCC			
	*tet*C	TCCTTGCATGCACCATTCC	635	s-PCR 7	
		AACCCGTTCCATGTGCTCG			

Chloramphenicol	*cml*A	CGCCACGGTGTTGTTGTTAT GCGACCTGCGTAAATGTCAC	394	m-PCR 9	Chen và ctv, 2004
	*cml*B	ACTCGGCATGGACATGTACT ACGGACTGCGGAATCCATAG	840		
	flo	CTGAGGGTGTCGTCATCTAC GCTCCGACAATGCTGACTAT	673		
Sulfamethoxazol	*sul*1	TCACCGAGGACTCCTTCTTC CAGTCCGCCTCAGCAATATC	331	m-PCR 10	
	*sul*2	CCTGTTTCGTCCGACACAGA GAAGCGCAGCCGCAATTCAT	435		
Streptomycin	*str*A	CCAATCGCAGATAGAAGGC CTTGGTGATAACGGCAATTC	608	m-PCR 11	Doosti và ctv, 2016
	*str*B	GGATCGTAGAACATATTGGC ATCGTCAAGGGATTGAAACC	256		
	*aad*A2	ATTTGCTGGTTACGGTGACC CTTCAAGTATGACGGGCTGA	431	m-PCR 12	
Gentamycin	*aad*B	CTAGCTGCGGCAGATGAGC CTCAGCCGCCTCTGGGCA	219		
Nalidixic acid	*gyr*A	CGTTGGTGACGTAATCGGTA CCGTACCGTCATAGTTATCC	251	m-PCR 13	Eaves và ctv, 2002
	*gyr*B	GCGCTGTCCGAACTGTACCT TGATCAGCGTCGCCACTTCC	181		
Ciprofloxacin	*par*C	CTATGCGATGTCAGAGCTGG TAACAGCAGCTCGGCGTATT	270	m-PCR 14	Eaves và ctv, 2004
	*par*E	TCTCTTCCGATGAAGTGCTG ATACGGTATAGCGGCGGTAG	240		

CHƯƠNG 3
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Xác định tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. đối với các nhóm thực phẩm

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành lấy ngẫu nhiên 1.520 mẫu (380 mẫu/nhóm) thuộc 4 nhóm (thịt, trứng, thủy hải sản, rau củ quả và các sản phẩm chế biến từ chúng) vào khoảng thời gian từ 08 đến 09 giờ sáng trong suốt 12 tháng (09/2019-09/2020) tại 38 chợ bán lẻ thuộc 19 quận trung tâm trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh để phân lập và xác định tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. trong các nhóm mẫu (Bảng 3.1).

Bảng 3.1. Địa điểm thu thập mẫu

STT	Địa điểm	Nơi lấy mẫu (Chợ)
01	Quận 1	Tân Định; Thái Bình
02	Quận 2	An Khánh; Đo Đạt
03	Quận 3	Vườn Chuối; Bùi Phát
04	Quận 4	Xóm Chiếu; Tôn Thất Thuyết
05	Quận 5	Bầu Sen; Phùng Hưng
06	Quận 6	Phú Lâm; An Dương Vương
07	Quận 7	Tân Mỹ; Tân Quy
08	Quận 8	Phạm Thế Hiển; Nhị Thiên Đường
09	Quận 9	Phước Long B; Hiệp Phú
10	Quận 10	Nguyễn Tri Phương; Hòa Hưng
11	Quận 11	Thiếc; Lãnh Binh Thăng
12	Quận 12	Hiệp Thành; Ngã Tư Ga
13	Quận Bình Tân	An Lạc; Kiến Đức 2
14	Quận Bình Thạnh	Bà Chiểu; Thị Nghè
15	Quận Gò Vấp	Gò Vấp; Xóm Mới
16	Quận Phú Nhuận	Phú Nhuận; Chợ Mới
17	Quận Tân Bình	Tân Bình; Hoàng Hoa Thám
18	Quận Thủ Đức	Thủ Đức; Linh Xuân
19	Quận Tân Phú	Tân Hương; Hiệp Tân

Theo tiêu chuẩn của FAO, Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với ô nhiễm vi sinh vật trong thực phẩm của Bộ Y tế thì *Salmonella* spp. không được có mặt trong các nhóm sản phẩm thịt, trứng, thủy hải sản, rau củ quả. Vì vậy, chúng tôi tiến hành xác định mức độ nhiễm *Salmonella* spp. cho mỗi loại sản phẩm theo từng nhóm và kết quả được thể hiện ở Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. đối với từng nhóm thực phẩm

Nhóm mẫu	Số mẫu nhiễm/Số mẫu lấy			Tỷ lệ nhiễm (%)		
	Tươi	Chế biến	Tổng	Tươi	Chế biến	Tổng
Nhóm thịt và sản phẩm thịt	161/228	03/152	164/380	70,61	1,97	43,16
Nhóm trứng và sản phẩm trứng	00/239	00/141	00/380	0	0	0
Nhóm thủy hải sản và sản phẩm thủy hải sản	91/301	00/79	91/380	30,23	0	23,95
Nhóm rau củ quả và sản phẩm rau củ quả	00/267	01/113	01/380	0	0,88	0,26
Tính chung		**256/1.520**			**16,84**	

Bằng kỹ thuật s-PCR1, chúng tôi phát hiện 256 mẫu dương tính với *Salmonella* spp., chiếm tỷ lệ 16,84% (Bảng 3.2). Trong 04 nhóm mẫu, nhóm thịt có tỷ lệ nhiễm cao nhất là 43,16% (164/380), tiếp theo là nhóm thủy hải sản với tỷ lệ 23,95% (91/380) và cuối cùng là nhóm rau củ quả chiếm tỷ lệ thấp nhất với 0,26% (01/380). Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. của hai nhóm thịt và thủy hải sản là điều đáng lo ngại cho sức khỏe cộng đồng vì nhóm thịt và thủy hải sản là một trong những mặt hàng thực phẩm nhu thiết yếu của người tiêu dùng hàng ngày. Bên cạnh đó, theo quy định của cơ quan quản lý thì vi khuẩn này không được phép có mặt trong các nhóm thực phẩm và các sản phẩm chế biến từ chúng mà chúng tôi lựa chọn nghiên cứu trong luận án này. Vì vậy, việc phát hiện *Salmonella* spp. từ các nhóm mẫu thiết yếu này sẽ cung cấp nhiều dẫn liệu khoa học cho cơ quan quản lý về an toàn thực phẩm xây dựng chính sách và định hướng chiến lược lâu dài trong việc kiểm soát mối nguy,

ngăn chặn, phòng ngừa, giảm thiểu các vụ ngộ độc thực phẩm xảy ra trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh.

Trong số các mẫu nhiễm *Salmonella* spp. thuộc nhóm thịt, chúng tôi nhận thấy mẫu thịt heo có tỷ lệ nhiễm cao nhất (90,79%), tiếp đến là mẫu thịt gà (77,63%), mẫu thịt bò có tỷ lệ nhiễm thấp nhất (43,42%) được thể hiện trong Bảng 3.3. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* và ba nguồn phân lập được tìm thấy mối liên quan có ý nghĩa thống kê với nhau ($p<0,05$). Ngoài ra, kết quả trong luận án này cao hơn nhiều so với các kết quả nghiên cứu khác như Đỗ Ngọc Thúy và ctv (2006) (47,1% thịt gà, 27,3% thịt heo và 19% thịt bò nhiễm *Salmonella*). Nguyen và ctv (2016) cho biết tỷ lệ nhiễm *Salmonella* từ 409 mẫu thịt được thu thập từ tháng 10/2012 đến tháng 3/2015 từ các lò mổ, chợ bán lẻ ở thành phố Hồ Chí Minh để kiểm tra. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* được phát hiện ở thịt heo (69,7%), gia cầm (65,3%), thịt bò (58,3%), riêng kết quả nhiễm *Salmonella* spp. của mẫu thịt bò thuộc nghiên cứu này cao hơn kết quả của chúng tôi. Từ các kết quả trên có thể thấy rằng, tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở các loại thịt bán lẻ là rất khác nhau, phụ thuộc vào khu vực địa lý thu thập mẫu.

Bảng 3.3. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. đối với thịt heo, bò, gà

Mẫu	Tổng số mẫu	Dương tính		Âm tính	
		Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)
Thịt heo	76	69	90,79	07	9,21
Thịt bò	76	33	43,42	43	56,58
Thịt gà	76	59	77,63	17	22,37
Tổng số	**228**	**161**	**70,61**	**67**	**29,39**

$\chi^2 = 43,7949$; $p < 0,00001$

So với các công trình ngoài nước, tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. đối với nhóm mẫu thịt có tỷ lệ nhiễm cao hơn so với kết quả được công bố ở một số nơi khác như: tại tỉnh Sơn Đông, Trung Quốc trong năm 2009 và 2012, Lai và ctv (2014) khi xác định mối quan hệ di truyền và kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. từ thực phẩm có nguồn gốc động vật cho thấy 50 trong số 692 mẫu thịt heo dương tính với *Salmonella* spp. (7,23%). Tại Romania Mihaiu và ctv (2014) khi tiến hành thu thập

650 mẫu thịt gà và thịt heo từ các đơn vị sản xuất và thị trường bán lẻ trong các khu vực khác nhau trong năm 2011 cho biết có 22,92% mẫu dương tính với *Salmonella* spp. trong 149 mẫu được phân lập. Từ tháng 8/2012 đến tháng 3/2013, Schoder và ctv (2014) đã thu thập 600 mẫu sản phẩm động vật nhập khẩu tại sân bay quốc tế Vienna, Áo để kiểm tra sự ô nhiễm vi sinh vật. Kết quả cho thấy có 1,2% mẫu dương tính với *Salmonella* spp. Tỷ lệ phát hiện 11,85% *Salmonella* spp. tại 3 lò mổ đại diện của các tỉnh Chiang Mai và Lamphun, Thái Lan từ tháng 5 đến tháng 10/2013 được thể hiện trong kết quả nghiên cứu của Tadee và ctv (2014).

Theo chúng tôi, sự khác biệt trong tỷ lệ nhiễm này có thể là do nhiều nguyên nhân. Một trong những nguyên nhân chính là do việc giết mổ gia súc, gia cầm địa điểm giết mổ thường là không vệ sinh như sân nhà, dụng cụ giết mổ là dao, xô, chậu thường là không được vô trùng, kết hợp với nguồn nước ô nhiễm. Hơn nữa thịt thành phẩm được vận chuyển và bày bán tự do và bảo quản không hợp vệ sinh ở chợ trong thời gian dài, kết hợp với người mua tiếp xúc với thịt khi xem làm thịt dễ bị nhiễm khuẩn hơn (Nguyễn Thanh Việt, 2018). Ngoài ra, theo tác giả Folster và ctv (2015), sự khác biệt trong tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. có thể là do loài vi khuẩn này sống phổ biến ở môi trường và đóng một vai trò quan trọng trong việc lây nhiễm giữa các nguồn bệnh. Hơn nữa, các loài *Salmonella* spp. phân bố rất khác nhau tùy theo từng quốc gia, khu vực. Do đó, các nguồn thực phẩm khác nhau có thể nhiễm các chủng *Salmonella* spp. với tỷ lệ khác nhau.

Bảng 3.4. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. đối với mẫu cá, tôm, mực

Mẫu	Tổng số mẫu	Dương tính		Âm tính	
		Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)
Cá	199	75	37,69	124	62,31
Tôm	67	10	14,93	57	85,07
Mực	35	06	17,14	29	82,86
Tổng số	**301**	**91**	**30,23**	**73**	**69,77**

$\chi^2 = 28,6874$; $p < 0,00001$

Kết quả khảo sát tại Bảng 3.4 cho thấy tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. đối với nhóm thủy hải sản là 30,23% (91/301). Giữa nguồn phân lập và tỷ lệ nhiễm *Salmonella* có liên quan ý nghĩa về mặt thống kê ($p<0,05$). Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của Phan và ctv (2005), từ tháng 3/2000 đến tháng 9/2001, 110 mẫu tôm bán lẻ từ sáu tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long ở Việt Nam đã được thu thập và phát hiện 24,5% mẫu nhiễm *Salmonella* spp.

So sánh với kết quả khảo sát của nhóm Van và ctv (2007a), kiểm tra sự hiện diện của *Salmonella* spp. trong 180 mẫu thực phẩm sống, trong đó có nhóm mẫu thủy hải sản, phát hiện 18% mẫu giáp sát hai mãnh vỏ nhiễm *Salmonella* spp., thấp hơn kết quả của chúng tôi. Ở một nghiên cứu khác, Nguyen và ctv (2016) cho biết tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. của 409 mẫu thủy hải sản sống được thu thập từ tháng 10/2012 đến tháng 3/2015 từ các chợ cá bán lẻ ở thành phố Hồ Chí Minh, tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. được phát hiện ở tôm (49,1%) và cá nước ngọt nuôi (36,6%).

Có thể nói nguyên nhân nhóm thịt và thủy hải sản có tỷ lệ nhiễm *Salmonella* một phần do việc kiểm soát nguồn gốc xuất xứ hàng hóa, chất lượng thực phẩm chưa được giám sát và theo dõi thường xuyên. Mặt khác, theo quan sát của nhóm nghiên cứu, việc bày bán các mặt hàng thịt và thủy hải sản tươi sống hiện nay tại các chợ truyền thống trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh chưa thật sự đảm bảo điều kiện về mặt vệ sinh. Hệ thống cống nước thải tại các chợ còn hở chưa được đóng kín. Môi trường xung quanh các sạp chưa thông thoáng và ẩm thấp. Các mặt hàng thủy hải sản chưa được bày bán trên kệ cao mà đặt gần sát với mặt đất, điều này tạo điều kiện vấy nhiễm vi sinh sinh vật từ không khí vào hàng hóa là rất cao. Đối với nhóm mẫu rau củ quả, chúng tôi ghi nhận một trường hợp duy nhất có nhiễm *Salmonella* spp. (0,26%).

Trong luận án này, chúng tôi chưa ghi nhận trường hợp nào có nhiễm *Salmonella* spp. đối với nhóm trứng. Kết quả này sơ bộ có thể đánh giá ngoài việc giám sát, khép kín chặt chẽ các khâu từ chọn giống, chuồng trại, lựa chọn, chế biến thức ăn thì đơn vị sản xuất thường xuyên cập nhật và thay đổi công nghệ sơ chế và bảo quản nên đã nâng cao chất lượng của trứng và sản phẩm chế biến từ chúng. Mặt

khác, dựa vào công nghệ độ tươi của trứng được giữ ổn định nên hệ enzyme lysozyme ít bị ảnh hưởng từ đó khả năng xâm nhiễm vi sinh vật vào bên trong trứng đã được hạn chế.

3.2 Đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp.

Chúng tôi đã tiến hành xác định đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp. phân lập từ các nhóm thực phẩm lấy tại các chợ bán lẻ trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh. Để thực hiện mục tiêu trên, chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật ở mục 2.5.2. Hình ảnh đại diện *Salmonella* spp. nhạy với một số kháng sinh được thể hiện trong Phụ lục B1.

3.2.1 Khả năng kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp.

Với 256 mẫu dương tính *Salmonella* spp., chúng tôi tiến hành phân lập và thu nhận 150 chủng *Salmonella* spp. Tiếp đến thử nghiệm khả năng nhạy với 11 loại kháng sinh, kết quả được trình bày trong Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Mức độ kháng kháng sinh của *Salmonella* spp.

Số lượng kháng sinh	Tỷ lệ (%)		
	Kháng	Trung gian	Nhạy
Chỉ 01 kháng sinh	11,33% (17)	43,33% (65)	1,33% (02)
Từ 03-06 kháng sinh	30,67% (46)	2,00% (03)	29,33% (44)
Từ 07-11 kháng sinh	14,00% (21)	0% (00)	63,33% (95)

Qua kết quả thu được cho thấy khả năng kháng chỉ một loại kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp. phân lập được chiếm 11,33%, có tỷ lệ cao nhất là kháng từ 03 đến 06 loại kháng sinh chiếm 30,67% và từ 07 đến 11 loại kháng sinh chiếm 14,00%. Với tỷ lệ kháng được khảo sát, cho thấy *Salmonella* phân lập từ thực phẩm có xu hướng kháng nhiều loại kháng sinh ngày càng gia tăng. Bên cạnh đó, tỷ lệ nhạy với kháng sinh cũng cần báo động. Theo kết quả thu được, tỷ lệ nhạy với 01 kháng sinh là 1,33%, điều này cho thấy khả năng nhạy với kháng sinh của *Salmonella* có nguồn gốc từ thực phẩm trong phạm vi luận án này là rất thấp, việc này sẽ rất khó khăn trong việc điều trị khi vật nuôi và người mắc phải *Salmonella* thông qua đường thực phẩm. Ngược lại, việc điều trị cần phải phối hợp nhiều loại kháng sinh mới có thể đạt hiệu

quả, nhận định này từ việc phân tích tỷ lệ nhạy từ 03 đến 06 kháng sinh là 30,67%; từ 07 đến 11 kháng sinh là 63,33%.

Bảng 3.6. Mức độ kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. từ thịt heo, gà, bò

Số lượng kháng sinh	Tỷ lệ (%) (Heo: 38; Gà: 36; Bò: 18)								
	Kháng			Trung gian			Nhạy		
	Heo	Gà	Bò	Heo	Gà	Bò	Heo	Gà	Bò
Chỉ 01 kháng sinh	21,05 (08)	2,78 (01)	5,56 (01)	50,00 (19)	30,56 (11)	44,44 (08)	0 (00)	5,56 (02)	0 (00)
Từ 03-06 kháng sinh	31,58 (12)	55,56 (20)	16,67 (03)	0 (00)	5,56 (02)	0 (00)	26,32 (10)	44,44 (16)	11,11 (02)
Từ 07-11 kháng sinh	5,26 (02)	13,89 (05)	5,56 (01)	0 (00)	0 (00)	0 (00)	71,05 (27)	50,00 (18)	83,33 (15)

Fisher's Exact test = 8,950; p = 0,039

Theo kết quả thể hiện ở Bảng 3.6. thì tỷ lệ kháng chỉ một loại kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp. phân lập từ thịt heo, bò, gà theo thứ tự lần lượt là 21,05% (08/38), 2,78% (01/36) và 5,56% (01/18); từ 03 đến 06 loại kháng sinh 31,58% (12/38), 55,56% (20/36), 16,67% (03/18); từ 07 đến 11 loại kháng sinh 5,26% (02/38), 13,89% (05/36), 5,56% (01/18). Đối với tỷ lệ kháng chỉ một loại kháng sinh thì các chủng *Salmonella* spp. phân lập từ thịt heo cao hơn so với các chủng từ thịt bò và gà (21,05%); tỷ lệ kháng từ 03 đến 06 loại kháng sinh và từ 07 đến 11 loại kháng sinh thì các chủng *Salmonella* spp. phân lập từ thịt gà chiếm tỷ lệ cao hơn so với hai nhóm mẫu còn lại (55,56% và 13,89%). Các chủng *Salmonella* spp. từ thịt bò có cùng tỷ lệ là 5,56% (01/18) kháng chỉ một và từ 07 đến 11 loại kháng sinh.

Không có chủng *Salmonella* spp. phân lập từ thịt heo và bò nhạy với chỉ một loại kháng sinh, riêng thịt gà là 5,56% (02/36). Tuy nhiên, các chủng *Salmonella* spp. thuộc phạm vi của luận án có tỷ lệ nhạy từ 07 đến 11 loại kháng sinh là khá cao, cao nhất là các chủng *Salmonella* spp. từ thịt bò cụ thể: thịt heo 71,05% (27/38), thịt gà 50,00% (18/36), thịt bò 83,33% (15/18). Bên cạnh đó, *Salmonella* phân lập từ thịt gà

có tỷ lệ kháng nhiều loại kháng sinh cao hơn hai nhóm mẫu còn lại. Nguyên nhân có thể do ảnh hưởng từ hậu quả của việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi gà hiện nay một cách tùy tiện và chưa được kiểm soát chặt chẽ bởi cơ quan chức năng. Mặt khác, nhận thức về tác hại khi lạm dụng kháng sinh từ người chăn nuôi chưa được phổ biến thường xuyên và đúng đắn. Ngoài ra, từ dữ liệu phân tích, luận án đã tìm thấy mối liên quan có ý nghĩa về mặt thống kê giữa số lượng kháng sinh mà *Salmonella* kháng so với nguồn phân lập ($p<0,05$).

Bảng 3.7. Mức độ kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. từ cá, mực, tôm

Số lượng kháng sinh	Tỷ lệ (%) (Cá: 43; Mực: 05; Tôm: 10)								
	Kháng			Trung gian			Nhạy		
	Cá	Mực	Tôm	Cá	Mực	Tôm	Cá	Mực	Tôm
Chỉ 01 kháng sinh	13,95 (06)	0 (00)	10,00 (01)	44,19 (19)	0 (00)	30,00 (03)	2,33 (01)	0 (00)	0 (00)
Từ 03-06 kháng sinh	18,60 (08)	40,00 (02)	10,00 (01)	16,28 (00)	40,00 (00)	10,00 (01)	30,23 (13)	40,00 (02)	10,00 (01)
Từ 07-11 kháng sinh	30,23 (13)	0 (00)	0 (00)	0 (00)	0 (00)	0 (00)	53,49 (23)	60,00 (03)	90,00 (09)

Fisher's Exact test = 4,934; p = 0,136

Mức độ kháng của các chủng *Salmonella* spp. từ thủy hải sản (cá, mực, tôm) được trình bày tại Bảng 3.7. Khả năng kháng chỉ một loại kháng sinh từ mẫu cá 13,95% (06/43) có tỷ lệ cao hơn mẫu mực và tôm. Đối với tỷ lệ kháng từ 03 đến 06 loại kháng sinh thì *Salmonella* spp. từ mẫu mực cao hơn hai mẫu còn lại. Tuy nhiên, không có chủng *Salmonella* spp. nào từ mẫu mực và tôm có khả năng kháng từ 07 đến 11 loại kháng sinh, chỉ duy nhất *Salmonella* spp. từ cá có tỷ lệ 30,23% (13/43) kháng từ 07 đến 11 loại kháng sinh. Không có mối liên quan giữa nguồn phân lập với số lượng kháng sinh mà *Salmonella* spp. kháng có ý nghĩa về mặt thống kê ($p>0,05$).

So sánh các nhóm mẫu với nhau thì tỷ lệ kháng chỉ một loại kháng sinh thì các *Salmonella* spp. từ nhóm thịt (21,05%) cao hơn nhóm thủy hải sản (13,95%). Tương

tự, tỷ lệ kháng từ 03 đến 06 loại kháng sinh *Salmonella* spp. nhóm thịt (55,56%) cũng cao hơn nhóm thủy hải sản (40,00%). Tuy nhiên, tỷ lệ kháng từ 07 đến 11 loại kháng sinh thì *Salmonella* spp. nhóm thủy hải sản (30,23%) ngược lại cao hơn nhóm thịt (13,89%). Điều này đã cho thấy tình hình xuất hiện và gia tăng các chủng *Salmonella* spp. có xu hướng kháng nhiều loại kháng sinh đang là mối nguy lớn đến sức khỏe cộng đồng. Do đó, việc đánh giá và đề xuất các giải pháp để giảm thiểu tình trạng kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. trong thực phẩm là rất cần thiết.

3.2.2 Khả năng kháng từng loại kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp.

Mức độ kháng từng loại kháng sinh của *Salmonella* spp. được trình bày trong Bảng 3.8.

Bảng 3.8. Mức độ kháng từng loại kháng sinh của *Salmonella* spp.

Kháng sinh	Tỷ lệ (%)		
	Kháng (n)	Trung gian (n)	Nhạy (n)
AMC	3,33 (05)	4,67 (07)	92,00 (138)
AMP	42,67 (64)	1,33 (02)	56,00 (84)
CAZ	4,00 (06)	1,33 (02)	94,67 (142)
C	36,00 (54)	4,67 (07)	59,33 (89)
NA	24,67 (37)	12,00 (18)	63,33 (95)
CIP	12,67 (19)	1,33 (02)	86,00 (129)
OFX	8,67 (13)	4,00 (06)	87,33 (131)
GM	16,00 (24)	5,33 (08)	78,67 (118)
STR	37,33 (56)	29,33 (44)	33,33 (50)
TE	52,00 (78)	3,33 (05)	44,67 (67)
SXT	34,67 (52)	2,00 (03)	63,33 (95)

$\chi^2 = 428,857$; $p < 0,00001$

Có năm loại kháng sinh mà *Salmonella* spp. có khả năng kháng nhiều là TE (52,00%), AMP (42,67%), STR (37,33%), C (36,00%), SXT (34,67%). Điều này cho thấy đây là các loại kháng sinh thường được chỉ định trong điều trị nhiễm *Salmonella* spp., đặc biệt AMP và SXT là hai kháng sinh được dùng phổ biến ở Việt Nam

(Nguyen và ctv, 2013). Không có loại kháng sinh nào hoàn toàn nhạy với tất cả *Salmonella* spp. phân lập từ các nhóm thực phẩm. Kháng sinh AMC có tỷ lệ *Salmonella* spp. kháng là thấp nhất (3,33%), tiếp đến là CAZ (4,00%) và OFX (8,67%). Có mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa tổng số chủng đề kháng, trung gian và nhạy với từng loại kháng sinh ($p<0,05$). Vi khuẩn *Salmonella* spp. kháng kháng sinh có nguồn gốc từ thực phẩm là mối nguy lan truyền các gen kháng cho các sinh vật khác, nguy hiểm hơn là cho người thông qua việc tiêu thụ thức ăn. So sánh với một số kết quả khác đã công bố chúng tôi thấy rằng tỷ lệ kháng kháng sinh của chúng tôi (52,00%) thấp hơn kết quả của một số công trình ở Việt Nam (77,5%) của Hoàng Hoài Phương và ctv (2008), (81,1%) của Nguyễn Đắc Trung (2012), (62,2%) của Nguyen và ctv (2016).

Trong phạm vi luận án, kháng sinh TE có nhiều *Salmonella* spp. kháng nhất với tỷ lệ 52,00%. Kết quả này khá tương đồng với kết quả của một số tác giả khác trên thế giới. Chen và ctv (2004), đã công bố tỷ lệ kháng TE của *Salmonella* spp. phân lập từ thịt là 68%. Cai và ctv (2016) báo cáo rằng, trong số các *Salmonella* spp. phân lập được từ thịt heo bán lẻ ở Dương Châu, Trung Quốc thì tỷ lệ kháng TE là cao nhất với 49,7%. Katoh và ctv (2015), công bố rằng trong số các *Salmonella* spp. từ thịt gà nội địa bán lẻ ở Tokyo, Nhật Bản thì có tới 77,8% kháng TE, chiếm tỷ lệ cao nhất trong số các kháng sinh bị kháng. Nghiên cứu của Tirziu và ctv (2015) cũng cho kết quả tương tự (66,6% kháng TE). Tỷ lệ kháng TE cao là điều dễ hiểu vì kháng sinh này được sử dụng rộng rãi ở Việt Nam, cả trong điều trị và chăn nuôi (Nguyen và ctv, 2013). Mặt khác, việc mua bán kháng sinh hiện nay trên thị trường rất phổ biến và tiện lợi, nên việc tiếp cận với một lượng lớn kháng sinh là điều rất dễ dàng. Vì vậy, không những kháng sinh TE mà bất kỳ loại kháng sinh nào hiện nay cũng được sử dụng rộng rãi với nhiều mục đích khác nhau. Điều này không những *Salmonella* mà các loài vi sinh sinh vật khác ngày càng có xu hướng giảm tỷ lệ nhạy với kháng sinh là tất yết trong tương lai.

Tỷ lệ các chủng *Salmonella* spp. nhạy hoàn toàn với 11 loại kháng sinh chỉ có 16,00% (24/150). Đối với *Salmonella* spp. có nguồn gốc thực phẩm, kháng nhóm

quinolone và cephalosporin được quan tâm nhất, cả hai nhóm kháng sinh này đều được đề cập đến trong danh sách các kháng sinh quan trọng của WHO trong lĩnh vực y học năm 2016. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ *Salmonella* spp. kháng CAZ (4,00%); NA (24,67%), CIP (12,67%), OFX (8,67%). Kháng sinh có tỷ lệ nhạy cao nhất đối với *Salmonella* spp. là CAZ (94,67%). Đây cũng là kháng sinh không bị kháng trong nghiên cứu của Nguyễn Thanh Việt và ctv (2018); với các *Salmonella* spp. từ các mẫu thịt gà thu thập ở Romania của Tirziu và ctv (2015), không có chủng nào kháng CAZ. Tỷ lệ nhạy với CAZ của chúng tôi thấp hơn so với báo cáo của Katoh và ctv (2015) là 99,8%. Từ kết quả này cho thấy CAZ là một kháng sinh tốt có thể dùng để điều trị nhiễm *Salmonella* spp. CAZ đã được phổ biến rộng rãi do hiệu quả của nó, do đó cần phải có chương trình giám sát tình hình sử dụng kháng sinh này một cách thường xuyên và chặt chẽ.

Tỷ lệ *Salmonella* spp. đa kháng của chúng tôi là 44,67% (67/150), thấp hơn kết quả của Katoh và ctv (2015) là (90,2%). Tỷ lệ này cao hơn so với kết quả của Nguyễn Thanh Việt và ctv (2018) là (36%); so với báo cáo của Nguyen và ctv (2016) là (41,1%); Choi và ctv (2015) là (29%). Sự khác biệt này có thể được lý giải là do tình hình sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi và điều trị khác nhau giữa các vùng, điều này làm tăng áp lực chọn lọc, dẫn tới sự xuất hiện và tồn tại các vi khuẩn kháng kháng sinh với tỷ lệ khác nhau. Việt Nam là nước đông dân thứ 15 trên thế giới và thứ 03 trong khu vực Đông Nam Á (sau Indonesia và Philipines). Bên cạnh đó, với một nền kinh tế có độ mở cao, Việt Nam sẽ chịu ảnh hưởng trực tiếp nhiều tác động tích cực lẫn tiêu cực đến từ bên ngoài, trong đó nổi bật là việc tiếp cận dễ dàng với kháng sinh mà chưa được kiểm soát hiệu quả, điều này cùng với gánh nặng bệnh truyền nhiễm đã làm cho Việt Nam trở thành điểm nóng tiềm ẩn cho sự xuất hiện vi khuẩn đa kháng (Nguyen và ctv, 2013). Các nghiên cứu tiếp theo về tỷ lệ kháng và đa kháng với quy mô và phạm vi lớn hơn là điều hết sức cần thiết.

3.2.3 Khả năng kháng từng loại kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp. theo nguồn phân lập

Số liệu từ Bảng 3.9. cho thấy *Salmonella* spp. có nguồn gốc từ thịt heo và gà kháng tất cả 11 loại kháng sinh thử nghiệm, trong đó các chủng *Salmonella* spp. từ thịt gà có tỷ lệ kháng với từng loại kháng sinh cao hơn các nguồn khác. Riêng AMC và CAZ nhạy hoàn toàn với các chủng *Salmonella* spp. từ thịt bò. Tuy nhiên, xét riêng từng loại kháng sinh thì *Salmonella* spp. từ thịt gà có tỷ lệ kháng cao hơn.

Bảng 3.9. Mức độ kháng từng loại kháng sinh của *Salmonella* spp. từ heo, gà, bò

	Thịt heo (n=38)		Thịt gà (n=36)		Thịt bò (n=18)		Chung (n=92)	
Kháng sinh	**Số chủng kháng**	**%**	**Số chủng kháng**	**%**	**Số chủng kháng**	**%**	**Số chủng kháng**	**%**
AMC	02	5,26	01	2,78	00	0	03	3,26
AMP	14	36,84	19	52,78	04	22,22	37	40,22
CAZ	02	5,26	03	8,33	00	0	05	5,43
C	12	31,58	22	61,11	02	11,11	36	39,13
NA	05	13,16	11	30,56	01	5,56	17	18,48
CIP	04	10,53	03	8,33	01	5,56	08	8,70
OFX	02	5,26	03	8,33	01	5,56	06	6,52
GM	03	7,89	06	16,67	01	5,56	10	10,87
STR	09	23,68	20	55,56	06	33,33	35	38,04
TE	21	55,26	23	63,89	07	38,89	51	55,43
SXT	12	31,58	20	55,56	03	16,67	35	38,04

Fisher’s Exact test = 10,004; p = 0,989

Đối với kháng sinh TE thì *Salmonella* spp. từ thịt gà có tỷ lệ kháng là 63,89% cao hơn 55,26% từ thịt heo, SXT có tỷ lệ 55,56% so với 31,58%, STR 55,56% so với 23,68%, C có tỷ lệ 61,11% so với 31,58%, AMP có tỷ lệ 52,78% so với 36,84%. Các chủng *Salmonella* spp. từ thịt bò có tỷ lệ kháng thấp nhất so với các chủng từ thịt gà

và heo. Xét về phương diện thống kê thì khả năng kháng từng loại kháng sinh của *Salmonella* spp. không có mối quan hệ với các nguồn phân lập (p>0,05).

So sánh với kết quả của Lê văn Du và Hồ Thị Kim Hoa (2017), tỷ lệ *Salmonella* spp. từ thịt heo kháng với C (79,17%), AMP (70,83%) và SXT (66,67%) cao hơn kết quả của chúng tôi lần lượt 31,58%, 36,84%, 31,58%; không kháng với CIP (một kháng sinh cephalosporin thế hệ thứ 3) tỷ lệ này thấp hơn báo cáo của chúng tôi là 10,53%. Trong khi đó, tỷ lệ kháng CIP của các *Salmonella* spp. từ thịt gà là 60% cao hơn nhiều so với kết quả của chúng tôi 8,33%. Đối với các chủng *Salmonella* spp. từ nhóm thủy hải sản thì tỷ lệ kháng thấp hơn so với các chủng từ nhóm thịt, được trình bày tại Bảng 3.10.

Bảng 3.10. Mức độ kháng từng loại kháng sinh của *Salmonella* spp. từ cá, mực, tôm

	Cá (n=43)		**Mực (n=05)**		**Tôm (n=10)**		**Chung (n=58)**	
Kháng sinh	**Số chủng kháng**	**%**	**Số chủng kháng**	**%**	**Số chủng kháng**	**%**	**Số chủng kháng**	**%**
AMC	01	2,33	00	0	02	20,00	03	5,17
AMP	22	51,16	02	40,00	01	10,00	25	43,10
CAZ	01	2,33	00	0	01	10,00	02	3,45
C	17	39,53	00	0	00	0	17	29,31
NA	19	44,19	00	0	01	10,00	20	34,48
CIP	11	25,58	00	0	01	10,00	12	20,69
OFX	07	16,28	00	0	00	0	07	12,07
GM	13	30,23	01	20,00	00	0	14	24,14
STR	19	44,19	02	40,00	00	0	21	36,21
TE	25	58,14	02	40,00	00	0	27	46,55
SXT	14	32,56	02	40,00	01	10,00	17	29,31

Fisher's Exact test = 25,071; p = 0,052

Salmonella spp. từ mẫu cá có khả năng kháng nhiều loại kháng sinh hơn từ mẫu tôm và mực. Kháng sinh có nhiều *Salmonella* spp. kháng vẫn là TE (cá: 58,14%,

mực: 40,00%), riêng các *Salmonella* spp. từ tôm hoàn toàn nhạy với loại kháng sinh này. Kháng sinh có tỷ lệ *Salmonella* spp. kháng đứng thứ hai là AMP (cá: 51,16%, mực: 40,00%, tôm: 10,00%) và thứ 3 là SXT (cá: 32,56%, mực: 40,00%, tôm: 10,00%). Không tìm thấy mối quan hệ có ý nghĩa thống kê về khả năng kháng từng loại kháng sinh của *Salmonella* spp. với các nguồn phân lập từ nhóm mẫu thủy hải sản ($p>0,05$).

Từ kết quả thu được chúng tôi nhận thấy, việc sử dụng cũng như kiểm soát có hiệu quả một số nhóm kháng sinh được phép sử dụng hoặc cấm sử dụng cho mục đích chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản hiện nay vẫn chưa được quản lý, kiểm soát một cách triệt để, điều này rất báo động cho việc sẽ làm gia tăng về mặt số lượng kháng sinh bị các chủng *Salmonella* spp. phân lập được từ thực phẩm kháng. Vì vậy, cần có nhiều chính sách định hướng và sự vào cuộc quyết liệt từ phía cơ quan quản lý nhà nước trong việc giám sát sử dụng kháng sinh một cách bền vững và lâu dài.

3.2.4 Kiểu hình kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp.

Từ kết quả xác định tính nhạy từng loại kháng sinh chúng tôi đã xác định được kiểu hình kháng chung của *Salmonella* spp., kết quả này được trình bày tại Phụ lục B2. Cho thấy kiểu hình đa kháng phổ biến là AMP, C, TE, SXT chiếm 8,51% (8/94); thứ hai là AMP, C, NA, GM, STR, TE, SXT chiếm 6,38% (6/94) và sau cùng là kiểu hình STR, TE 5,32% (5/94). Tuy nhiên, kiểu hình đa kháng với nhiều nhóm kháng sinh nhất là AMP, CAZ, C, NA, CIP, OFX, GM, STR, TE, SXT và AMP, C, NA, CIP, OFX, GM, STR, TE, SXT chiếm 3,19% (3/94). Điều này cho thấy có thể đây là xu thế gia tăng tính đa kháng của *Salmonella* spp.

Số liệu từ Phụ lục B3 thể hiện, trong số các chủng *Salmonella* spp. từ thịt gà và cá tươi thì có kiểu hình đa kháng với nhiều nhóm kháng sinh nhất. Các chủng *Salmonella* spp. từ thịt heo và gà có cùng kiểu hình đa kháng là AMP, C, TE, SXT chiếm tỷ lệ lần lượt là 13,16% (5/38) và 8,33% (3/36). Trong đó chỉ các chủng *Salmonella* spp. từ mẫu cá và thịt heo mới có kiểu hình đa kháng với nhiều loại kháng sinh khác nhau (10 loại). Về số lượng *Salmonella* spp. có kiểu hình đa kháng nhiều thì phải kể đến các *Salmonella* spp. từ mẫu cá. Cụ thể 03 chủng có kiểu hình AMP,

C, NA, CIP, OFX, GM, STR, TE, SXT; 02 chủng có kiểu hình AMP, C, NA, CIP, OFX, GM, STR, TE và 03 chủng có kiểu hình AMP, C, NA, GM, STR, TE, SXT.

Kiểu hình kháng phổ biến của chúng tôi (AMP, C, TE, SXT) tương tự như báo cáo của Hoàng Hoài Phương và ctv (2008). Tuy nhiên, điều này khác với công bố của Lê Văn Du và Hồ Thị Kim Hoa (2017); Nguyễn Thanh Việt và ctv (2018). Kết quả trên có thể nhận định rằng kiểu hình kháng phổ biến có khác nhau giữa các nghiên cứu. Việc xác định kiểu hình kháng, kết hợp với kết quả giải trình tự và công cụ phân tích tin sinh học sẽ cho biết gen nào, cũng như các đột biến có hay không liên quan đến tình trạng đa kháng.

Nhiều công trình trên thế giới cho thấy *Salmonella* spp. phân bố khác nhau theo quốc gia, vùng lãnh thổ, địa lý và theo nguồn bệnh. Vì vậy, tỷ lệ kháng và đa kháng cũng khác nhau theo từng khu vực. Do đó, việc khảo sát tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. ở thực phẩm và nghiên cứu đặc điểm kháng kháng sinh của chúng là hoàn toàn phù hợp và cần thiết. Kết quả nghiên cứu có thể là nguồn dẫn liệu khoa học trong việc xây dựng các mô hình đánh giá nguy cơ và ngăn ngừa lây truyền *Salmonella* spp. từ thực phẩm sang người ở thành phố Hồ Chí Minh nói riêng và Việt Nam nói chung. Đặc biệt, chúng tôi luôn nhấn mạnh sự cần thiết phải giám sát chặt chẽ tình hình sử dụng kháng sinh, theo dõi xu hướng kháng kháng sinh ở các chủng *Salmonella* spp., nâng cao nhận thức và thúc đẩy các biện pháp làm giảm tỷ lệ kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. trong tương lai.

3.3 Kết quả xác định serovar của *Salmonella* spp. đa kháng

Sau khi phân lập và xác định được kiểu hình đa kháng của các chủng *Salmonella* spp. từ các mẫu thu thập, chúng tôi lựa chọn 21 chủng *Salmonella* spp. có khả năng kháng từ 07 loại kháng sinh trở lên để xác định serovar của chúng bằng phương pháp theo mục 2.5.2. Kết quả định type kháng huyết thanh và số lượng các serovar được trình bày ở Bảng 3.11.

Bảng 3.11. Kết quả xác định serovar các chủng *Salmonella* spp. đa kháng

Nguồn phân lập	Công thức kháng nguyên			Công thức	Serovar	Ký hiệu
	Kháng nguyên O	Kháng nguyên H				
		Pha 1	Pha 2			
Thịt heo	8	i	1,z_6	8:i:1,z6	*S.* Kentucky	SA11/19 3497
	4	z	1,7	4:1,7:z	*S.* Indiana	SA11/19 4221
Thịt bò	7	r	1,5	7:1,5:r	*S.* Infantis	SA07/20 3335
Thịt gà	4	f,s,g		4:f,s,g	*S.* Agona	SA11/19 3498
	7	r	1,5	7:1,5:r	*S.* Infantis	SA12/19 1584
	7	l,v	en,z_{15}	7:L,v:en,z_{15}	*S.* Potsdam	SA05/20 1114
	8	i	1,z_6	8:i:1,z_6	*S.* Kentucky	SA07/20 1066
	8	i	1,z_6	8:i:1,z_6	*S.* Kentucky	SA07/20 1067
Cá	8	i	1,z_6	8:i:1,z_6	*S.* Kentucky	SA11/19 3514
	4	eh	1,2	4:eh:1,2	*S.* Saintpaul	SA11/19 3515
	7	e,h	e,n,z_{15}	7:e,h:e,n,z_{15}	*S.* Braenderup	SA11/19 4205
	8	i	1,z_6	8:i:1,z_6	*S.* Kentucky	SA12/19 501
	8	i	1,z_6	8:i:1,z_6	*S.* Kentucky	SA12/19 1600
	7	l,v	en,z_{15}	7:L,v:en,z_{15}	*S.* Potsdam	SA01/20 66
	8	i	1,z_6	8:i:1,z_6	*S.* Kentucky	SA02/20 1524
	7	r	1,5	7:1,5:r	*S.* Infantis	SA05/20 210
	4	f,s,g		4:f,s,g	*S.* Agona	SA06/20 1808
	7	r	1,5	7:1,5:r	*S.* Infantis	SA06/20 1809
	OMF	1,z_6		OMF:1,z_6:UT[a]	-	SA07/20 460
	7	1,z_6		7:1,z_6:UT[a]	-	SA07/20 462
	8	i	1,z_6	8:i:1,z_6	*S.* Kentucky	SA08/20 2058

Ghi chú: [a]: không xác định

Trong số 21 chủng *Salmonella*, cả ba nguồn phân lập có số lượng serovar khác nhau, trong đó các mẫu thịt heo xác định được hai serovar là Kentucky và Indiana;

các mẫu thịt bò chỉ phát hiện duy nhất một serovar là Infantis; mẫu thịt gà phát hiện được năm serovar trong đó số lượng một có Agona, Infantis, Potsdam và ba Kentucky; riêng mẫu cá có số lượng serovar được phát hiện nhiều nhất, trong đó serovar Kentucky (năm chủng), còn lại mỗi chủng cho các serovar Saintpaul, Braenderup, Potsdam, Infantis, Agona. Tuy nhiên, hai chủng *Salmonella* có ký hiệu SA07/20 460 và SA07/20 462 từ mẫu cá, chúng tôi không nhận diện được serovar nên chỉ ghi nhận công thức kháng huyết thanh, vì trong quá trình thử nghiệm ngưng kết với kháng nguyên H quá trình chuyển pha không xảy ra. Trong 08 mẫu thịt (heo: 02; bò: 01; gà: 05) và 13 mẫu cá nhiễm *Salmonella*, serovar phổ biến nhất là Kentucky (8 chủng), thứ hai là Infantis (4 chủng), thứ ba là Agona và Potsdam (2 chủng), thấp nhất là Saintpaul, Braenderup và Indiana (1 chủng).

Chúng tôi nhận thấy, ở các nghiên cứu khác nhau thì serovar phổ biến cũng khác nhau. Ví dụ, Nguyễn Thanh Việt và ctv (2018) phân lập *Salmonella* từ thịt, Typhimurium là serovar duy nhất phân lập được ở cả ba nguồn thịt. Trong 11 mẫu thịt gà nhiễm *Salmonella* spp., serovar phổ biến là Typhimurium với 4 chủng, phổ biến thứ hai là Warragul, Indiana và Rissen với 2 chủng. Ngược lại, Derby phổ biến trong các mẫu thịt heo với 4 chủng, Typhimurium với 2 chủng. Thịt bò nhiễm *Salmonella* spp. ít nhất với 5 mẫu và tất cả đều là Typhimurium. Moe và ctv (2017) phân lập *Salmonella* từ thịt gà bán lẻ ở Myanmar thì *S.* Albany phổ biến nhất (38%). Patchanee và ctv (2016) đánh giá tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trên các mẫu thịt heo bán lẻ ở Thái Lan, kết quả là *S.* Rissen phổ biến nhất. Ngoài ra còn nhiều công bố khác trên thế giới cũng cho kết quả khác nhau về các serovar phổ biến nhất phân lập được. Điều này hoàn toàn phụ thuộc vào khu vực địa lý và thời gian thu thập mẫu.

3.4 Mức độ kháng từng loại kháng sinh của serovar theo nguồn phân lập

Tỷ lệ các serovar đa kháng theo nguồn phân lập được xác định trong Bảng 3.12.

Bảng 3.12. Số lượng serovar đa kháng kháng sinh theo nguồn phân lập

Serovar	Thịt heo (n=2)		Thịt bò (n=1)		Thịt gà (n=5)		Cá (n=13)	
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)
S. Kentucky	01	50,0	-	-	02	40,0	05	38,46
S. Indiana	01	50,0	-	-	-	-	-	-
S. Infantis	-	-	01	100,0	01	20,0	02	15,38
S. Agona	-	-	-	-	01	20,0	01	7,69
S. Saintpaul	-	-	-	-	-	-	01	7,69
S. Braenderup	-	-	-	-	-	-	01	7,69
S. Potsdam	-	-	-	-	01	20,0	01	7,69
OMF:1,z_6:UT[a]	-	-	-	-	-	-	01	7,69
7:1,z_6:UT[a]	-	-	-	-	-	-	01	7,69
Tổng (n=21)	2/21	9,52	1/21	4,76	5/21	23,81	13/21	61,90

Kết quả từ Bảng 3.12, cho thấy *Salmonella* spp. từ mẫu cá có số lượng serovar đa kháng nhiều nhất, 61,90% (13/21 chủng). Tiếp theo là các chủng từ thịt gà 23,81% (5/21 chủng), thịt heo 9,52% (2/21), cuối cùng là thịt bò 4,76% (1/21). *S.* Kentucky là serovar chiếm đa số ở cả ba nguồn phân lập (thịt heo: 01; thịt gà: 02; cá: 05 chủng), chỉ duy nhất *Salmonella* từ thịt bò không phát hiện serovar Kentucky.

Mức độ kháng từng loại kháng sinh của các serovar phân lập từ các nguồn khác nhau được xác định và trình bày trong Phụ lục B4. Qua đó cho thấy 100% serovar phân lập được kháng STR và TE. Kháng sinh có tỷ lệ serovar kháng ít nhất là AMC 9,52% (2/21), kế đến là CAZ 23,81% (5/21). Điều này cho thấy AMC và CAZ vẫn còn tác dụng đối với các serovar đa kháng phân lập được. Các *S.* Indiana, *S.* Infantis, *S.* Saintpaul, *S.* Braenderup có tỷ lệ nhạy với AMC là 100,0%, *S.* Agona 50,0%, *S.* Kentucky 5,26%. Riêng *S.* Kentucky có ký hiệu 07/20 1066; 07/20 1067 và 12/19 1600 có số lượng kháng sinh kháng là cao nhất (10 loại).

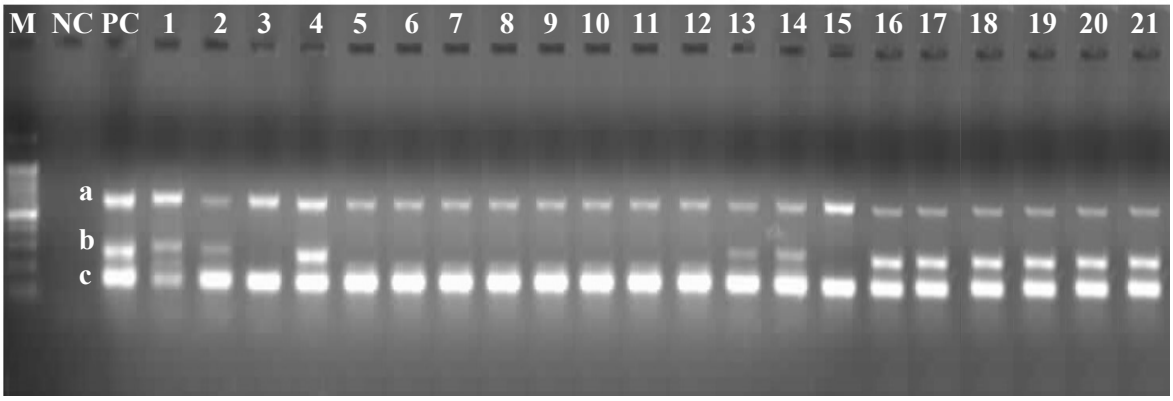
3.5 Sự hiện diện các nhóm integron của *Salmonella*

Integron là yếu tố di truyền di động có vai trò quan trọng trong việc phát tán các gen kháng kháng sinh của vi khuẩn Gram âm, đặc biệt là chúng hiện diện phổ biến ở các vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* (Fluit và Schmitz, 1999). Cho đến nay, các integron đã được tìm thấy ở các loài vi khuẩn gây bệnh ở người, gia súc, gia cầm và các các loài vi khuẩn hiện diện trong các môi trường tự nhiên (Martinez, 2009; Yang và ctv, 2010; Koczura và ctv, 2014). Kết quả khảo sát chi thấy, integron nhóm 1, 2 và 3 được tìm thấy ở các serovar *Salmonella* đa kháng phân lập được từ các nhóm thực phẩm lần lượt là 100%, 52,38% và 100%. Tỷ lệ phát hiện *Salmonella* mang cùng lúc ba nhóm integron là 52,38% (Hình 3.1).

Kết quả từ Bảng 3.13, cho thấy tần suất hiện diện integron 1, 2 và 3 của chúng tôi có kết quả tương đối cao hơn so với các công trình trước đây. Jones và ctv (2003) cho rằng 47% các chủng *Salmonella* đa kháng phân lập được mang ít nhất một loại integron, chỉ có một chủng mang integron cả hai nhóm 1 và 2, trong khi đó integron 3 không được phát hiện. Tuy nhiên, Asgharpour và ctv (2018) cho biết, integron nhóm 1, 2 và 3 đã được tìm thấy trong số các serovar *Salmonella* Infantis phân lập từ thực phẩm tại Iran có tỷ lệ lần lượt là 36%, 42%, 22%, mang cả integron 1 và 2 là 4%. Ngoài ra, nhóm tác giả này còn cho biết khả năng kháng NA và TMP thường phổ biến nhất ở các serovar chứa các integron 1 và 2.

Một kết quả khác của Irani và ctv (2018), công bố đã thực hiện trên 100 chủng *Salmonella* từ các mẫu gà thịt ở Iran. Tỷ lệ phát hiện của các integron 1, 2, 3 lần lượt là 50%, 28% và 48%. Dựa trên kết quả phân tích, nhóm tác giả đã nhận định, khả năng đề kháng với GM, TE và C tăng lên khi có sự hiện diện của các integron. Điều thú vị là 21,3% các chủng mang integron 3 có khả năng kháng GM trong khi các chủng không mang integron 3 nhạy với kháng sinh này. Ngoài ra, khả năng kháng TE đã tăng từ 2,4% ở các chủng không mang integron 3 lên 17% ở các chủng có mang integron 3. Kết quả của chúng tôi cho thấy, các integron 1 và 3 thường xuyên xuất hiện với các serovar *Salmonella* có kiểu hình kháng nhóm β-lactam,

aminoglycoside, tetracycline và sulfonamide. Trong đó, đáng quan tâm có ba serovar không còn khả năng nhạy với CAZ đó là Kentucky (03), Indiana (01) và Agona (01).



Hình 3.1. Kết quả xác định các nhóm integron ở *Salmonella*

Chú thích: M: Thang chuẩn 100bp plus; NC: Chứng âm; PC: Chứng dương [a: Int3 (600 bp), b: Int2 (233 bp), c: Int1 (164 bp)]; 1-21: các mẫu khảo sát

Hiện tại, các integron 2 được tìm thấy chủ yếu ở vi khuẩn gây bệnh cho người, động vật và hiện diện trên các môi trường tự nhiên (Goldstein và ctv, 2001; White và ctv, 2001; Kim và ctv, 2010). Nghiên cứu của Saenz và ctv (2004) cho thấy 4/17 chủng (chiếm 23,53%) *Salmonella* có nguồn gốc từ người, động vật và thực phẩm có các integron 2. Sự hiện diện các integron có liên quan chặt chẽ đến khả năng kháng quinolon, aminoglycoside, sulfonamide, phenicol và kháng sinh nhóm β-lactam (Rijavec và ctv, 2006). Điều này phù hợp với kết quả thu được của chúng tôi. Sự tồn tại của integron 1, 2 và 3 trong các *Salmonella* có liên quan đáng kể đến khả năng kháng ở hầu hết các chủng phân lập từ thực phẩm và điều này chỉ ra vai trò của chúng góp phần trong việc lan truyền các gen kháng trong môi trường là rất rõ ràng và đáng quan tâm.

Bảng 3.13. Sự hiện diện các nhóm integron của serovar *Salmonella*

Ký hiệu	Serovar	Kiểu hình kháng kháng sinh	*Int*1	*Int*2	*Int*3
SA11/19 3497	*S.* Kentucky	AMC/AM-C-NA/CIP/OFX-STR-TE	+	+	+
SA11/19 4221	*S.* Indiana	CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	+
SA07/20 3335	*S.* Infantis	AM-C-NA/CIP/OFX-STR-SXT	+	+	+
SA11/19 3498	*S.* Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	+	-	+
SA12/19 1584	*S.* Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	+	+
SA05/20 1114	*S.* Potsdam	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	-	+
SA07/20 1066	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	+
SA07/20 1067	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	+
SA11/19 3514	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	+	+
SA11/19 3515	*S.* Saintpaul	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	+	-	+
SA11/19 4205	*S.* Braenderup	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	+	+
SA12/19 501	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	+	+
SA12/19 1600	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	+	+
SA01/20 66	*S.* Potsdam	AM-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	+	-	+
SA02/20 1524	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	+
SA05/20 210	*S.* Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	+	+
SA06/20 1808	*S.* Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	+	+	+

SA06/20 1809	*S.* Infantis	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE	+	+	+
SA07/20 460	OMF:1,z_6:UT	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	+
SA07/20 462	7:1,z_6:UT	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	+	+
SA08/20 2058	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE	+	-	+

3.6 Đặc điểm vùng gen cassette của *Salmonella* dương tính với integron 1, 2

Các gen cassette nằm giữa vùng 5'-CS và 3'-CS của các integron 1 và có kích thước thay đổi tùy thuộc vào các gen kháng được chèn vào. Đặc điểm vùng gen cassette của các serovar *Salmonella* được xác định tại Bảng 3.14. Đối với các integron 1, kết quả khảo sát cho thấy vùng gen cassette được khuếch đại ở 18/21 chủng *Salmonella* (85,71%) với 08 kích thước khác nhau (> 1,0 kbp; 1,0 kbp; 0,9 kbp; 0,6 kbp; 0,5 kbp; 0,4 kbp; 0,25 kbp; 0,2 kbp). Vùng gen cassette của integron 1 được khuếch đại nhiều nhất là vùng có kích thước 0,6 kbp (9/21, 42,86%), kế đến là 1,0 kbp (7/21, 33,33%), 0,25 kbp (6/21, 28,57%), 0,9 kbp (5/21, 23,81%), > 1,0 kbp (4/21, 19,05%) 0,4 và 0,2 kbp (2/21, 9,53%) và thấp nhất là 0,5 kbp (1/21, 4,76%). Tỷ lệ các serovar của *Salmonella* không mang vùng gen cassette thuộc integron 1 là 14,29% (3/21), mang cùng lúc 4 vùng là 4,76% (1/21), 3 và 2 vùng là 23,81% (5/21), 1 vùng 33,33% (7/21). Vùng gen cassette có kích thước > 1,0 kbp chủ yếu hiện diện ở serovar Kentucky với tỷ lệ 50% (4/8), các serovar này mang chung các gen *bla*CTX/TEM là gen mã hóa enzyme β-lactamase phổ rộng ESBL; gen *gyr*A,B/*par*C mã hóa enzyme DNA gyrase và topisomerase IV kháng đối với NA, OFX và CIP; gen *tet* mã hóa cho các protein bảo vệ ribosome kháng TE; gen *sul* ức chế dihyrdropteroate synthetase kháng SXT.

Tất cả các serovar chứa vùng gen cassette thuộc integron 1 có kích thước 0,9 và 1,0 kbp đều mang chung các gen *gyr*A,B/*par*C,E-*tet*A,C-*sul*1 có khả năng kháng các kháng sinh thuộc nhóm quinolon, tetracycline và sulfonamide. Kết quả còn cho thấy, tất cả các serovar chứa vùng cassette thuộc integron 1 thì 100% mang gen *tet*; 94,44% mang gen *gyr*A,B/*par*C,E; 88,89% mang gen *sul*1,2; 61,11% mang gen *bla*TEM/CTX; 44,44% mang gen *str*A; 16,67% mang gen *dhfr,* 5,56% mang gen *cml*A. Chúng tôi nhận định có sự tồn tại mối tương quan giữa integron chứa các vùng gen cassette với khả năng kháng AM, NA, CIP, SXT, STR, GM và TE của các serovar phân lập từ thực phẩm. Điều này cũng đã được giải thích từ các nghiên cứu trước đây, phần lớn các vùng gen cassette liên kết với integron 1 của nhiều loài vi khuẩn mang gen kháng với aminoglycoside (White và ctv, 2001; Yang và ctv, 2010). Tuy nhiên,

sự khác nhau về tỷ lệ xuất hiện cũng như sự kết hợp, sắp xếp của các gen trong vùng gen cassette ở các vi khuẩn cho đến nay vẫn chưa được chứng minh. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần được thực hiện để làm sáng tỏ vấn đề này.

Vùng gen cassette thuộc integron 2 được xác định tại Bảng 3.14. Kết quả cho thấy tỷ lệ serovar mang vùng gen cassette là 72,73% với 05 kích thước khác nhau (2,0 kbp; 1,6 kbp; 1,0 kbp; 0,7 kbp; 0,5 kbp). Sự đa dạng của các vùng gen cassette chèn vào integron 2 thấp hơn so với integron 1. Điều này được Moura và ctv (2007) giải thích có lẽ là do xảy ra đột biến ở codon 179 của gen mã hóa enzyme integrase thuộc integron 2, từ đó tạo ra một protein bị cắt ngắn và mất chức năng, dẫn đến hoạt động của integrase bị hạn chế và không thể loại bỏ các vùng gen cassette hiện có hoặc chèn vùng mới vào integron. Sự sắp xếp vùng gen cassette phổ biến trong các integron 2 được tìm thấy ở các serovar *Salmonella* lần lượt là (*gyr*A,B/*par*C,E-*tet*A-*sul*1,2); (*aad*2-*dhfr*). Vùng gen cassette *aad*2-*dhfr* được phát hiện thường xuyên nhất trong các integron 2 (Van và ctv, 2007b; Kang và ctv, 2005). Hơn nữa, các serovar *Salmonella* dương tính với integron 1 và 2 kháng với các loại kháng sinh khác nhau nhưng các vùng gen cassette liên quan không được tìm thấy, điều này Chang và ctv (2000) cho rằng hiện tượng kháng của vi khuẩn không phải từ nguồn integron. Kết quả thu được trong luận án này, vùng gen cassette được khuếch đại bằng PCR ở integron 2 thấp hơn so với integron 1.

Qua kết quả thu được, chúng tôi xác định được một số serovar, mặc dù có kiểu hình đa kháng và có mang gen integron 1 và 2 nhưng không được chèn các vùng gen cassette. Dawes và ctv (2010) cho biết, khác biệt này có thể do sự thay đổi trong vùng 3′CS của integron so với vị trí bắt cặp của các primer trong quá trình thực hiện phản ứng PCR. Ngoài ra, có một số serovar chứa nhiều nhóm integron và vùng gen cassette, điều này cho thấy các integron hiện diện tại các vùng nhiễm sắc thể khác nhau của các serovar đã được phân lập. Mặt khác, mối tương quan đáng kể của các integron 1 và 2 được chèn các vùng gen cassette có khả năng kháng NA, SXT, AM, C, OFX, CIP và TE cũng được phát hiện.

Bảng 3.14. Sự hiện diện các vùng gen cassette thuộc integron 1 của *Salmonella*

Nguồn	Ký hiệu	Serovar	Kiểu hình kháng kháng sinh	Integron		Kích thước vùng gen cassette (kbp)	
				***IntI*1**	***IntI*2**	***IntI*1**	***IntI*2**
Thịt heo	SA11/19 3497	*S.* Kentucky	AMC/AM-C-NA/CIP/OFX-STR-TE	+	+	-	0,7
	SA11/19 4221	*S.* Indiana	CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	0,25	1,0; 0,7
Thịt bò	SA07/20 3335	*S.* Infantis	AM-C-NA/CIP/OFX-STR-SXT	+	+	1,0; 0,9	-
Thịt gà	SA11/19 3498	*S.* Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	+	-	0,25	1,0; 0,7;
	SA12/19 1584	*S.* Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	+	1,0	2,0; 1,6; 1,0; 0,7
	SA05/20 1114	*S.* Potsdam	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	-	1,0; 0,6; 0,25	1,0; 0,7
	SA07/20 1066	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	> 1,0; 0,6	2,0; 0,7
	SA07/20 1067	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	> 1,0; 0,6; 0,4	0,7
Cá	SA11/19 3514	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	+	-	0,7
	SA11/19 3515	*S.* Saintpaul	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	+	-	0,2	1,0; 0,6
	SA11/19 4205	*S.* Braenderup	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	+	1,0; 0,2	1,0; 0,7
	SA12/19 501	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	+	> 1,0	-
	SA12/19 1600	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	+	-	-
	SA01/20 66	*S.* Potsdam	AM-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	+	-	2,5	1,0; 0,7
	SA02/20 1524	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	0,6; 0,4	1,7; 1,0; 0,7
	SA05/20 210	*S.* Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	+	1,0; 0,9; 0,6	1,6; 1,0; 0,7
	SA06/20 1808	*S.* Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	+	+	0,6; 0,25	2,0; 1,0; 0,7; 0,5

	SA06/20 1809	*S.* Infantis	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE	+	+	1,0; 0,9; 0,5	0,7
	SA07/20 460	OMF:1,z_6:UT	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	0,6	2,0; 1,0; 0,7
	SA07/20 462	7:1,z_6:UT	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	+	1,0; 0,9; 0,6; 0,25	1,0; 0,7
	SA08/20 2058	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE	+	-	> 1,0; 0,9; 0,6	0,7

3.7 Đặc điểm plasmid của *Salmonella* spp.

Phát hiện 100% serovar đều mang plasmid. Mang nhiều plasmid nhất là Kentucky với số lượng là 08 plasmid, Potsdam là 07 plasmid; Infantis, Saintpaul, Braenderup, Agona và 7:1,z_6:UT mang 05 plasmid, mang 04 plasmid là các serovar OMF:1,z_6:UT và Indiana (Bảng 3.15).

Bảng 3.15. Tỷ lệ mang plasmid đối với các serovar của *Salmonella*

Serovar (n=21)	Số lượng	Loại plasmid (n=18)	Tỷ lệ (%)
S. Kentucky	08	*N-FIB-W-Y-A/C-T- K/B-B/O*	44,44
S. Potsdam	07	*N-FIB-W-Y-P-A/C-*F_{repb}	38,89
S. Agona	06	*N-W-Y-P-A/C-T*	33,33
S. Braenderup	05	*N-W-Y-P-T*	27,78
S. Saintpaul	05	*N-W-Y-P-T*	27,78
S. Infantis	05	*N-W-Y-P-T*	27,78
7:1,z_6:UT	05	*N-W-Y-P-T*	27,78
S. Indiana	04	*N-W-Y-T*	22,22
OMF:1,z_6:UT	04	*N-W-Y-T*	22,22

Sự hiện diện của plasmid khá đa dạng (10/18 loại) ở các serovar khác nhau. Trong số đó, *W* và *Y* là plasmid phổ biến nhất với tỷ lệ hiện diện trong các serovar phân lập (100%), tiếp đến là các plasmid *N, T, P, A/C, FIB* với tỷ lệ lần lượt là 85,71%, 66,67%, 38,10%, 28,57%, 9,52%; các plasmid *Frepb*, *K/B*, *B/O* được phát hiện với tỷ lệ thấp 4,76%. Không phát hiện serovar nào mang *HI1, HI2, I1, X, L/M, FIIA, FIC, FIA*. Cụ thể, plasmid *Inc*A/C hiện diện ở *S.* Agona (01), *S.* Kentucky (03) và *S.* Potsdam (02) mang gen *bla*TEM-*str*A-*tet*A-*sul*2 phổ biến nhất (Bảng 3.16). Điều này phù hợp với công trình của Cao và ctv (2018), plasmid *Inc*A/C đã được phân lập ở *Salmonella* có chứa tới 10 gen kháng cho hơn 5 loại kháng sinh. Các gen kháng phổ biến nhất được mang bởi *Inc*A/C là *str*AB, *sul*2, *tet*AR, *bla*CMY-2 và *flo*R. Các chủng *Salmonella* được phân lập tại Hoa Kỳ, plasmid *Inc*A/C đã được tìm thấy trong

một số serovar khác nhau và một số sản phẩm từ động vật, đặc biệt là gia súc (Folster và ctv, 2017; Mollenkopf và ctv, 2017).

Bảng 3.16. Tỷ lệ phát hiện các loại plasmid trên các serovar *Salmonella*

Loại plasmid	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Serovar (n=21)
N	18	85,71	*S.* Agona (01); *S.* Braenderup (01); *S.* Indiana (01); *S.* Infantis (03); *S.* Kentucky (07); *S.* Potsdam (02); *S.* Saintpaul (01); OMF:1,z6:Ut (01); 7:1,z6:UT (01)
FIB	02	9,52	*S.* Kentucky (01); *S.* Potsdam (01)
W	21	100	*S.* Agona (02); *S.* Braenderup (01); *S.* Indiana (01); *S.* Infantis (04); *S.* Kentucky (08); *S.* Potsdam (02); *S.* Saintpaul (01); OMF:1,z6:Ut (01); 7:1,z6:UT (01)
Y	21	100	*S.* Agona (02); *S.* Braenderup (01); *S.* Indiana (01); *S.* Infantis (04); *S.* Kentucky (08); *S.* Potsdam (02); *S.* Saintpaul (01); OMF:1,z6:Ut (01); 7:1,z6:UT (01)
P	8	38,10	*S.* Agona (01); *S.* Braenderup (01); *S.* Infantis (03); *S.* Potsdam (01); *S.* Saintpaul (01); 7:1,z6:UT (01)
A/C	06	28,57	*S.* Agona (01); *S.* Kentucky (03); *S.* Potsdam (02)
T	14	66,67	*S.* Agona (01); *S.* Braenderup (01); *S.* Indiana (01); *S.* Infantis (03); *S.* Kentucky (06); *S.* Saintpaul (01); OMF:1,z6:Ut (01)
Frepb	01	4,76	*S.* Potsdam (01)
K/B	01	4,76	*S.* Kentucky (01)
B/O	01	4,76	*S.* Kentucky (01)
HI1-HI2-I1-X-L/M-FIIA-FIC-FIA	0	0	-

Các loại plasmid phân bổ theo kiểu gen kháng là rất khác nhau. Plasmid *W*, *Y* xuất hiện trong các serovar mang gen kháng, *N* xuất hiện ở serovar mang gen *bla*CTX,

A/C phân bổ ở serovar mang gen *clm*. Đánh giá sự phân bổ số lượng plasmid theo kiểu gen kháng của các serovar *Salmonella* chúng tôi nhận thấy: các serovar mang 3, 4 plasmid thường xuất hiện các chủng mang gen *bla*CTX, các serovar có kiểu gen *dhfr* thì chủ yếu mang 5 plasmid. Mang 6 plasmid chỉ xuất hiện ở các chủng mang kiểu gen *clm* (Bảng 3.17).

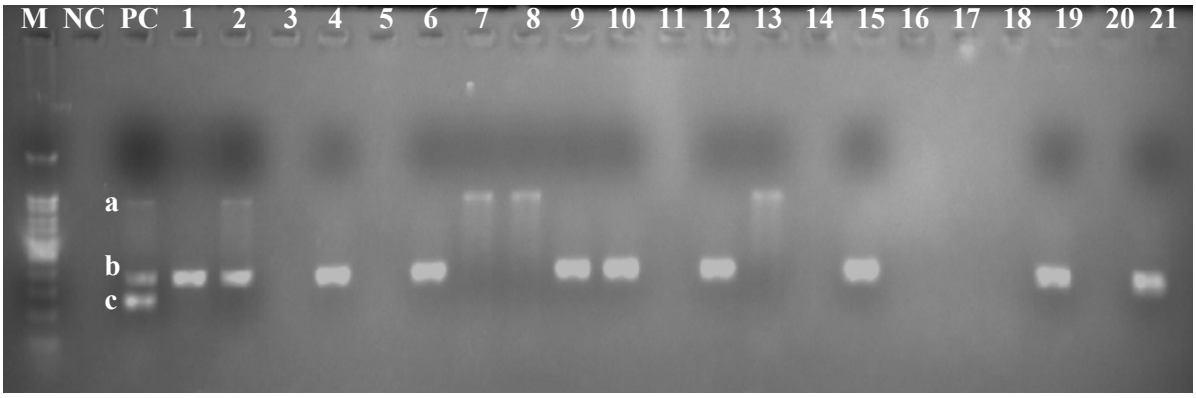
Bảng 3.17. Số lượng plasmid và kiểu hình kháng kháng sinh của *Salmonella*

Nguồn	Ký hiệu	Serovar	Kiểu hình kháng kháng sinh	Số lượng plasmid	Các loại plasmid
Thịt heo	SA11/19 3497	*S.* Kentucky	AMC/AM-C-NA/CIP/OFX-STR-TE	06	*N-W-Y-T-K/B-B/O*
	SA11/19 4221	*S.* Indiana	CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	04	*N-W-Y-T*
Thịt bò	SA07/20 3335	*S.* Infantis	AM-C-NA/CIP/OFX-STR-SXT	05	*N-W-Y-P-T*
Thịt gà	SA11/19 3498	*S.* Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	03	*W-Y-A/C*
	SA12/19 1584	*S.* Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	04	*W-Y-P-T*
	SA05/20 1114	*S.* Potsdam	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	06	*N-FIB-W-Y-A/C-*F_{repb}
	SA07/20 1066	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	03	*N-W-Y*
	SA07/20 1067	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	04	*N-W-Y-T*
Cá	SA11/19 3514	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	05	*N-FIB-W-Y-T*
	SA11/19 3515	*S.* Saintpaul	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	05	*N-W-Y-P-T*
	SA11/19 4205	*S.* Braenderup	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	05	*N-W-Y-P-T*
	SA12/19 501	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	03	*N-W-Y*
	SA12/19 1600	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	05	*N-W-Y-A/C-T*
	SA01/20 66	*S.* Potsdam	AM-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	05	*N-W-Y-P-A/C*
	SA02/20 1524	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	05	*N-W-Y-A/C-T*
	SA05/20 210	*S.* Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	04	*N-W-Y-T*

	SA06/20 1808	*S.* Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	05	*N-W-Y-P-T*
	SA06/20 1809	*S.* Infantis	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE	04	*N-W-Y-P*
	SA07/20 460	OMF:1,z_6:UT	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	04	*N-W-Y-T*
	SA07/20 462	7:1,z_6:UT	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	04	*N-W-Y-P*
	SA08/20 2058	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE	04	*W-Y-A/C-T*

3.8 Sự hiện diện gen mã hóa sinh ESBL

Kháng sinh nhóm β-lactam có chung cấu trúc phân tử gồm một vòng bốn cạnh, được gọi là vòng β-lactam. Enzyme β-lactamase có thể phá vỡ vòng bốn cạnh này làm mất hoạt tính của kháng sinh, thường được tiết ra chủ yếu bởi vi khuẩn Gram âm, rất phổ biến ở *Salmonella* (Liu và Pop, 2009). Hiện nay, dựa trên trình tự các axit amin, β-lactamase được chia thành bốn loại, trong đó loại A và C là phổ biến hơn cả. Để thủy phân vòng β-lactam, loại A, C và D sử dụng serine và loại B sử dụng metallo enzyme kết hợp với các ion kẽm (Bush và ctv, 2010). Các gen mã hóa sinh β-lactam như *bla*CTX, *bla*SHV, *bla*TEM đã được phát hiện ở 21 serovar *Salmonella* phân lập từ thực phẩm có khả năng kháng AMC, AM và CAZ (Hình 3.2). Trong số các gen được phát hiện thì gen *bla*TEM chiếm tỷ lệ cao nhất 52,38%, tiếp đến là gen *bla*CTX 19,05%, riêng gen *bla*SHV không được phát hiện ở tất cả 21 serovar. Điều này cũng được Cao và ctv (2002) nhận định gen *bla*TEM và *bla*CTX là 2 gen phổ biến thường được tìm thấy ở nhiều vật chủ cũng như ở nhiều vùng khác nhau trên thế giới.



Hình 3.2. Kết quả xác định gen mã hóa sinh ESBL

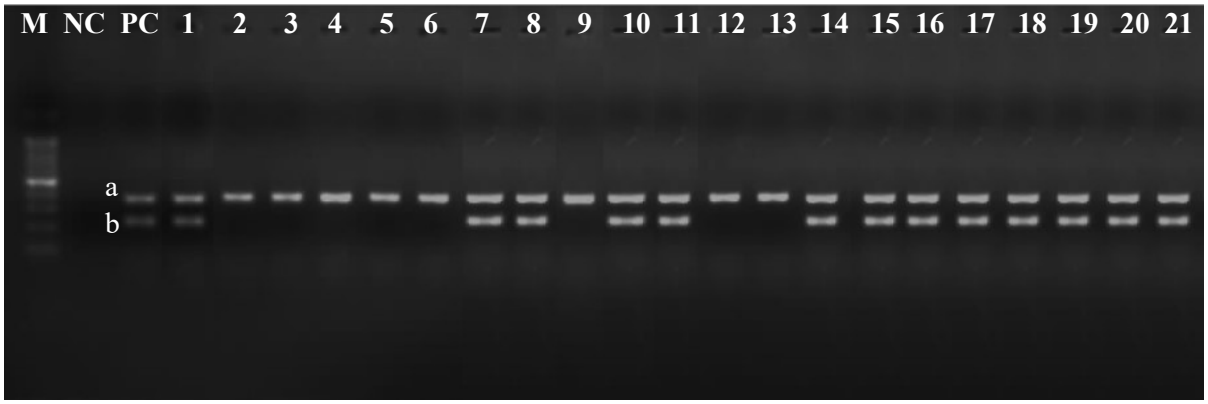
Chú thích: M: Thang chuẩn 100bp plus; NC: Chứng âm; PC: Chứng dương [a: blaCTX (950 bp), b: blaTEM (372 bp), c: blaSHV (231 bp)]; 1-21: mẫu khảo sát

Kết quả ghi nhận được, gen *bla*CTX chiếm ưu thế với tỷ lệ là 52,38%. Theo Asma (2006), kiểu gen CTX mã hoá β-lactamase là phổ biến trong các chủng sinh ESBL trên toàn thế giới. Kiểu gen này chủ yếu được tìm thấy ở Nam Mỹ, Viễn Đông và Đông Âu và cũng được ghi nhận ở Trung Quốc, Nhật Bản, Ấn Độ, Bắc Mỹ và Tây Âu. Trong số 21 serovar thì chỉ có *S.* Indiana mang cả hai gen (*bla*CTX, *bla*TEM)

cùng lúc với 4,76%. Đối với gen *bla*TEM và *bla*CTX hiện diện nhiều ở serovar Kentucky có tỷ lệ lần lượt là 23,81%, 14,29%. Ngoài ra, chúng tôi phát hiện được các gen mã hóa enzyme β-lactamase loại A (*bla*TEM) biểu hiện 11/21 chủng, các gen này có vai trò kháng AMC, AM. Kết quả phân tích cũng cho thấy có 3 serovar Kentucky có kiểu hình kháng CAZ đều mang gen *bla*TEM, *bla*CTX. CAZ là kháng sinh cephalosporin thế hệ thứ 3. Các β-lactamase thủy phân nhóm kháng sinh này phần lớn thuộc nhóm CTX, mã hóa bởi gen *bla*CTX. Ngoài ra, chủng SA11/19 4221 kháng CAZ mang cùng lúc cả hai gen *bla*TEM/CTX. Xét theo nguồn phân lập thì các serovar *Salmonella* có khả năng sinh β-lactamase cao nhất từ thịt heo (100%), thịt gà 80%, cá tươi 46,15% (Bảng 3.18).

3.9 Sự hiện diện gen kháng nhóm tetracyline

Các gen này mã hóa bơm ngược thải kháng sinh, các gen *tet* khác có chức năng bảo vệ ribosome của *Salmonella* khỏi tác dụng của tetracyline. Các gen kháng TE như *tet*A, *tet*B, *tet*C đã được phát hiện ở 21 serovar *Salmonella* phân lập (Hình 3.3 và 3.4). Trong số các gen *tet* được phát hiện thì *tet*A có tỷ lệ cao nhất (95,24%); gen *tet*C (57,14%); riêng *tet*B phát hiện thấp nhất (4,76%) trong luận án này.

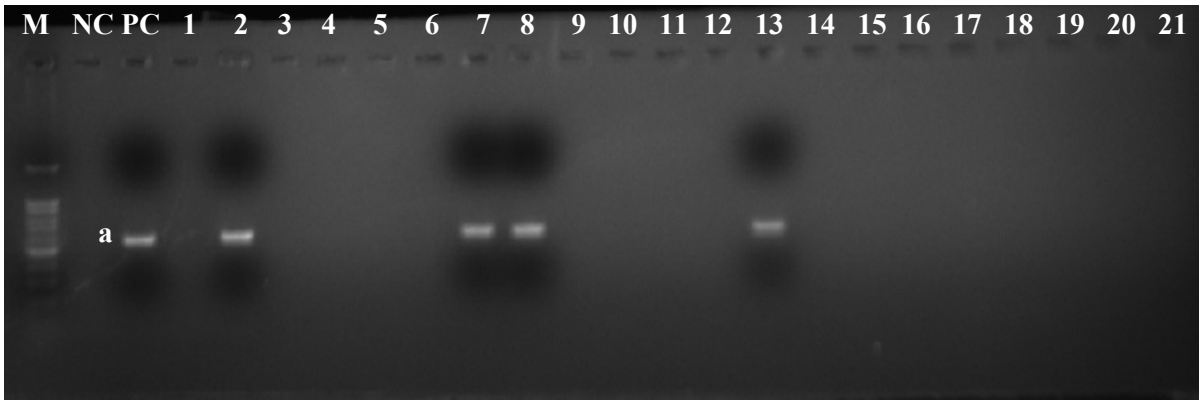


Hình 3.3. Kết quả xác định gen *tet*A, *tet*B mã hóa kháng tetracyline

Chú thích: M: Thang chuẩn 100bp plus; NC: Chứng âm; PC: Chứng dương [a: tetA (372 bp), b: tetB (228 bp)]; 1-21: các mẫu khảo sát

Sự hiện diện của gen *tet*A mã hóa cho quá trình bơm đẩy trong cơ chế kháng TE của vi khuẩn đã được nhiều tác giả báo cáo (Dang và ctv, 2007; Chenia và Vietze, 2012). Hầu hết các gen mã hóa kênh bơm thải TE đều có khả năng kháng TE, nhưng

ít hiệu quả hơn so với thế hệ thứ hai là doxycycline, minocycline và ít gây kháng hoặc không kháng thế hệ thứ ba, chẳng hạn như tigecycline (Chopra và ctv, 2001). Đặc biệt, kết quả tổng hợp từ Bảng 3.18 cho thấy 1 số serovar *Salmonella* có nhiều hơn 01 gen *tet* trong bộ gen của chúng, cụ thể 12 serovar mang 4 gen *tet*A,B,C (57,14%), 05 chủng mang 2 gen *tet*A,C (23,81%). Tuy nhiên, riêng SA07/20 3335 có hiện diện gen *tet*A,C nhưng kiểu hình không kháng TE, hiện tượng này có thể được lý giải vì mức độ biểu hiện của gen *tet*A,C là chưa đủ và đây được xem như một mối nguy dự báo mức độ gia tăng kháng TE trong tương lai.



Hình 3.4. Kết quả xác định gen *tet*C mã hóa kháng tetracyline

Chú thích: M: Thang chuẩn 100bp plus; NC: Chứng âm; PC: Chứng dương [a: tetC (635 bp)]; 1-21: các mẫu khảo sát

Tetracyline thuộc nhóm kháng sinh phổ rộng, được sử dụng phổ biến trong lĩnh vực thú ý và nuôi trồng thủy sản ở nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam để kiểm soát các nguồn bệnh do vi khuẩn (Schwarz và ctv, 2001). Do đó, nhiều nghiên cứu cho thấy vi khuẩn đã kháng với nhiều loại kháng sinh nhóm này (Van và ctv, 2007a, 2008). Nhiều gen *tet* mã hóa cho các loại protein tham gia vào các cơ chế kháng TE của vi khuẩn đã được xác định. Hiện tại, có hơn 40 gen kháng TE đã được xác định và giải trình tự (Chopra và ctv, 2001). Tuy nhiên, 3 trong số các gen kháng TE thường gặp nhất là *tet*A, *tet*B và *tet*C (Roberts, 2005).

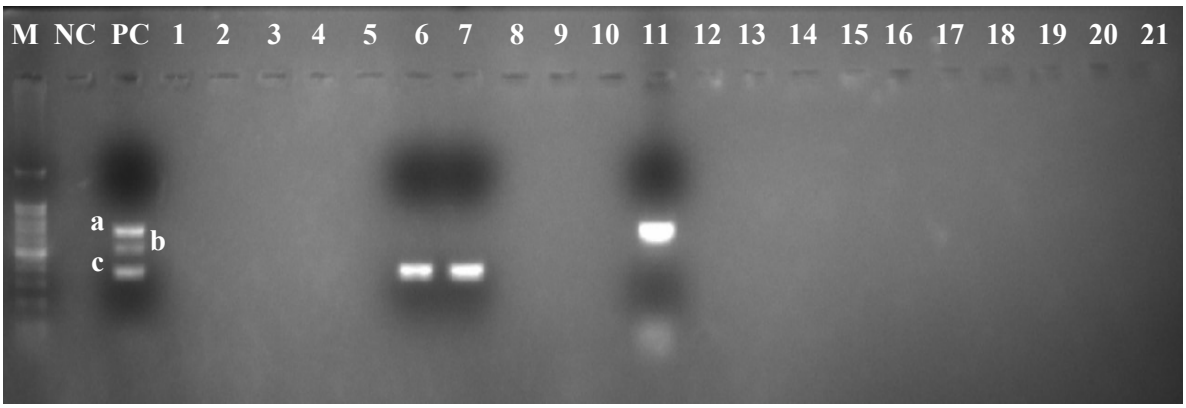
Bảng 3.18. Sự hiện diện gen mã hóa sinh ESBL và kháng tetracycline

Nguồn	Ký hiệu	Serovar	Kiểu hình kháng kháng sinh	*bla* TEM	*bla* SHV	*bla* CTX	*tet*A	*tet*B	*tet*C
Thịt heo	SA11/19 3497	*S.* Kentucky	AMC/AM-C-NA/CIP/OFX-STR-TE	+	-	-	+	+	-
	SA11/19 4221	*S.* Indiana	CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	+	+	-	+
Thịt bò	SA07/20 3335	*S.* Infantis	AM-C-NA/CIP/OFX-STR-SXT	-	-	-	+	-	-
Thịt gà	SA11/19 3498	*S.* Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	+	-	-	+	-	-
	SA12/19 1584	*S.* Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	-	-
	SA05/20 1114	*S.* Potsdam	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	-	-	+	-	-
	SA07/20 1066	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	-	-	+	+	+	+
	SA07/20 1067	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	-	-	+	+	+	+
Cá	SA11/19 3514	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	-	+	-	-
	SA11/19 3515	*S.* Saintpaul	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	+	-	-	+	+	-
	SA11/19 4205	*S.* Braenderup	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	-
	SA12/19 501	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	-	+	-	-
	SA12/19 1600	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	-	-	+	+	-	+
	SA01/20 66	*S.* Potsdam	AM-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	-
	SA02/20 1524	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	-	+	+	-
	SA05/20 210	*S.* Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	-
	SA06/20 1808	*S.* Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	-	-	-	-	+	-

SA06/20 1809	*S.* Infantis	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE	-	-	-	+	+	-
SA07/20 460	OMF:1,z_6:UT	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	-	+	+	-
SA07/20 462	7:1,z_6:UT	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	-
SA08/20 2058	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE	+	-	-	+	+	-

3.10 Sự hiện diện gen kháng nhóm phenicol

Phenicol hoạt động bằng cách bám vào peptidyltransferase của tiểu phần 50S ribosome, làm ngăn cản sự hình thành liên kết peptid giữa các axit amin. Ở *Salmonella*, có nhiều gen tham gia kháng lại các kháng sinh nhóm này, bao gồm bất hoạt O-acetyltransferase (gen *cat*1 và *cat*2), các gen thuộc hệ thống kênh bơm ngược thải kháng sinh (*cml*A, *flo*R) (Khan và ctv, 2012). Phản ứng PCR được thực hiện với 3 cặp mồi đặc hiệu cho các gen *cml*A, *cml*B và *flo* để xác định khả năng kháng C của 21 serovar phân lập được (Hình 3.5).



Hình 3.5. Kết quả xác định gen *cmlA, cmlB và flo* mã hóa kháng phenicol

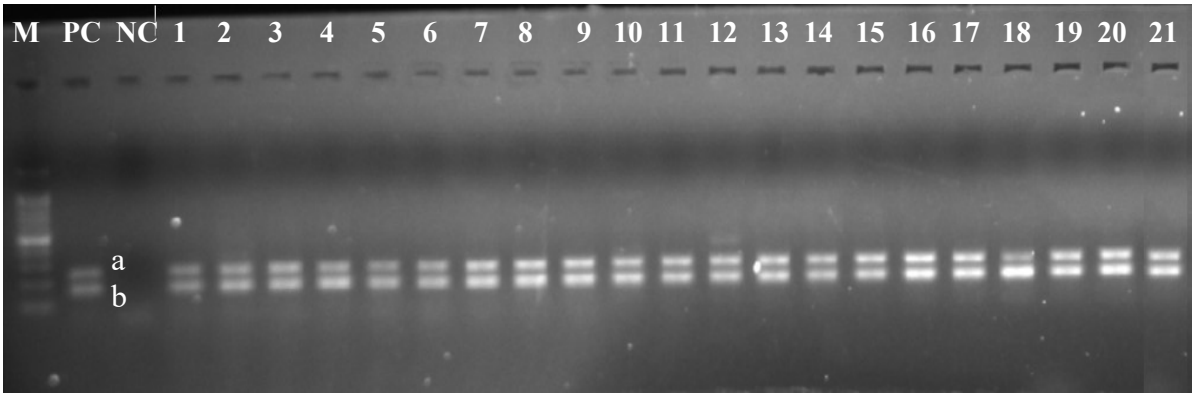
Chú thích: M: Thang chuẩn 100bp plus; NC: Chứng âm; PC: Chứng dương [a: cmlB (840 bp), b: flo (673 bp), c: cmlA (394 bp)]; 1-21: các mẫu khảo sát

Kết quả từ Bảng 3.19 cho thấy không có serovar nào mang gen *flo,* 02 serovar mang gen *cml*A tỷ lệ 9,52%, 01 mang gen *cml*B tỷ lệ 4,76%. Nhìn chung tỷ lệ các serovar trong luận án này mang gen kháng C thấp hơn so với β-lactam, TE,… Trong ngiên cứu này chỉ xuất hiện gen *cmlA* và biểu hiện ở các chủng kháng với C, chứng tỏ chúng có vai trò trong việc kháng kháng sinh ở các mẫu này.

3.11 Sự hiện diện gen kháng nhóm quinolon

Kháng sinh nhóm quinolone được sử dụng phổ biến trong điều trị nhiễm *Salmonella* đa kháng ở người và thú y do phổ tác dụng rộng của chúng. Đối với *Salmonella* có nguồn gốc thực phẩm, kháng quinolone được quan tâm và đã được đề cập đến trong danh sách các kháng sinh quan trọng nhất của WHO trong lĩnh vực y học năm 2016. Một trong những cơ chế kháng quinolone ở *Salmonella* là do đột biến

các gen *gyr*A, *gyr*B và *par*C (Abatcha và ctv, 2014). NA là kháng sinh có số lượng *Salmonella* kháng nhiều nhất với tỷ lệ 95,24%, tiếp đến là CIP 66,67% và sau cùng là OFX 52,38%. Kết quả từ Hình 3.6 cho thấy tỷ lệ phát hiện các gen kháng kháng sinh thuộc nhóm quinolon là rất cao với tỷ lệ 100% đối với các gen *gyr*A, *gyr*B, *par*C và 95,24% đối với gen *par*E.



Hình 3.6. Kết quả xác định gen *gyr*A, *gyr*B mã hóa kháng quinolon

Chú thích: M: Thang chuẩn 100bp plus; PC: Chứng dương [a: gyrA (251 bp), b: gyrB (181 bp)]; NC: Chứng âm; 1-21: các mẫu khảo sát

Đối chiếu với kiểu hình kháng của nhóm quinolon thì các chủng trong nghiên cứu này có tính tương đồng với kiểu gen chỉ thấp hơn nhóm tetracycline 95,24%. Các gen *gyr*A, *gyr*B biểu hiện ở cả chủng kháng (20/21) và chủng nhạy với NA (1/21). Chủng SA11/19 3498 nhạy với NA cũng có hiện diện cả hai gen *gyr*A, *gyr*B. Gen *par*C kháng CIP và OFX hiện diện 14/21 chủng kháng CIP, 11/21 chủng kháng OFX. Chỉ có duy nhất chủng SA11/19 3498 không có biểu diện gen *par*E và tương đồng với kiểu hình là nhạy với ofloxacin. Khả năng kháng khác nhau trong cùng một nhóm quinolone có thể được quy định từ nhiều gen khác nhau chứ không nhất thiết chỉ tập trung vào một vài gen cụ thể nào đó. Gen *parE* liên quan đến kháng OFX, điều này chỉ mới phát hiện ở một serovar nhưng là nền tảng để xác định việc kháng OFX ở những chủng còn nhạy với OFX bằng kỹ thuật tái tổ hợp DNA và biểu hiện gen. Thêm vào đó, việc lạm dụng quinolone có thể làm tăng sự tích lũy đột biến trong các gen mã hóa DNA gyrase và topoisomerase, dẫn đến sự xuất hiện của các chủng *Salmonella* kháng quinolone (Gopal và ctv, 2016).

Bảng 3.19. Sự hiện diện gen kháng nhóm phenicol và quinolon

Nguồn	Ký hiệu	Serovar	Kiểu hình kháng kháng sinh	*cml*A	*cml*B	*flo*	*gyr*A	*gyr*B	*par*C	*par*E
Thịt heo	SA11/19 3497	*S.* Kentucky	AMC/AM-C-NA/CIP/OFX-STR-TE	-	-	-	+	+	+	+
	SA11/19 4221	*S.* Indiana	CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	+	+
Thịt bò	SA07/20 3335	*S.* Infantis	AM-C-NA/CIP/OFX-STR-SXT	-	-	-	+	+	+	+
Thịt gà	SA11/19 3498	*S.* Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	-	-	-	+	+	+	-
	SA12/19 1584	*S.* Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	+	+
	SA05/20 1114	*S.* Potsdam	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	-	-	+	+	+	+
	SA07/20 1066	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	-	+	+	+	+
	SA07/20 1067	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	+	+
Cá	SA11/19 3514	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	+	+
	SA11/19 3515	*S.* Saintpaul	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	+	+
	SA11/19 4205	*S.* Braenderup	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	-	+	-	+	+	+	+
	SA12/19 501	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	+	+
	SA12/19 1600	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	+	+
	SA01/20 66	*S.* Potsdam	AM-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	+	+
	SA02/20 1524	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	+	+
	SA05/20 210	*S.* Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	+	+
	SA06/20 1808	*S.* Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	-	-	-	+	+	+	+
	SA06/20 1809	*S.* Infantis	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE	-	-	-	+	+	+	+

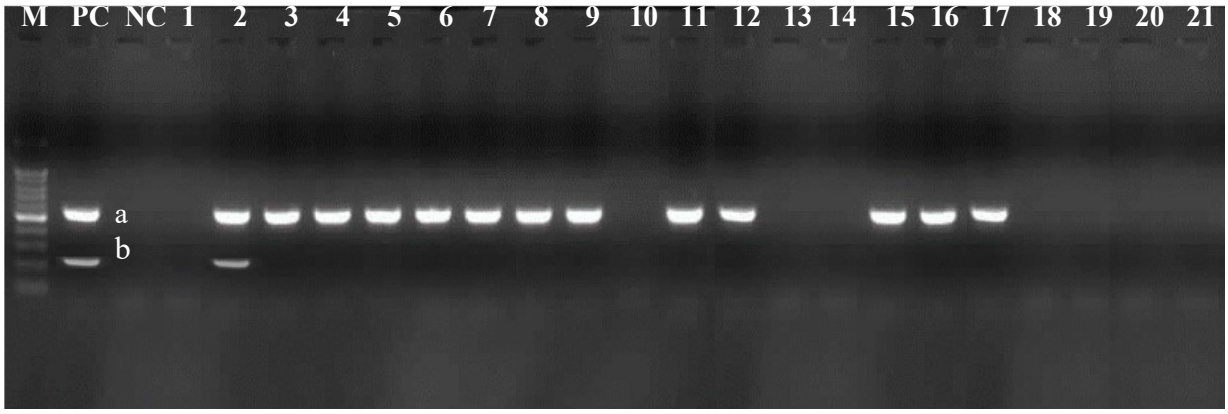
	SA07/20 460	OMF:1,z_6:UT	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	+	+
	SA07/20 462	7:1,z_6:UT	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	+	+	+	+
	SA08/20 2058	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE	-	-	-	+	+	+	+

3.12 Sự hiện diện gen kháng nhóm aminoglycoside

Aminoglycoside là kháng sinh phổ rộng được sử dụng phổ biến trong điều trị nhiễm trùng. Aminoglycoside hoạt động bằng cách liên kết với tiểu đơn vị 30S ribosomal của vi khuẩn (một số liên kết với tiểu đơn vị 50S), ức chế sự di chuyển của peptidyl-tRNA từ vị trí A sang vị trí P, khiến vi khuẩn không thể tổng hợp protein quan trọng cho sự phát triển của chúng. Các loại kháng sinh aminoglycoside khác nhau liên kết với các vị trí khác nhau trên rRNA, tùy thuộc vào cấu trúc của kháng sinh. Sự thay đổi cấu trúc của aminoglycoside dẫn đến giảm đáng kể khả năng kháng sinh liên kết với RNA. Ở vi khuẩn, khả năng kháng aminoglycoside thường là do acetyltransferase (Aac), nucleotidyltransferase (adenylyltransferases, Ant) và phosphotransferase (Aph) (Liu và Pop, 2009). Gen *aad* mã hóa aminoglycoside-3'-adenylyltransferase (Aad), tạo ra khả năng kháng STR và SPT bằng cách adenylylation (White và ctv, 2001). Trình tự nucleotide của gen *aad*B, tạo ra khả năng kháng K, GN và TOB, đã được xác định. Các gen *str*A và *str*B mã hóa các enzym bất hoạt và tạo ra khả năng kháng STR ở ít nhất 17 chi vi khuẩn gram âm trong đó có *Salmonella* (Cameron và ctv, 1986).

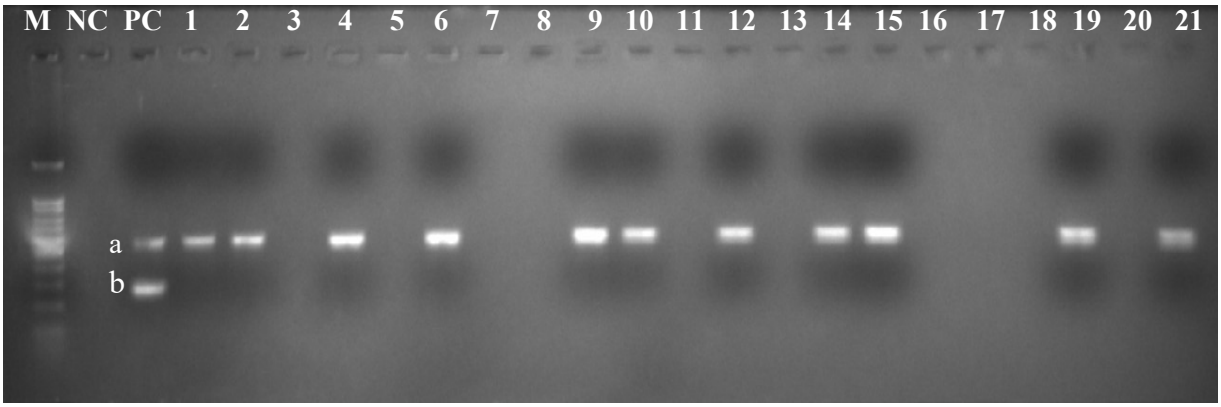
Kết quả của luận án cho thấy sự phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình của hai kháng sinh thuộc nhóm aminoglycoside là STR và GN ở các mẫu là hoàn toàn khác nhau. STR là một trong những kháng sinh có tỷ lệ *Salmonella* kháng 100%, tuy nhiên tỷ lệ phát hiện gen *str*A, *aad*A2, *aad*B lần lượt là 52,38%, 57,14%, 4,76% (Hình 3.7 và 3.8). Kết quả của chúng tôi cao hơn so với Chen và ctv (2004) với tỷ lệ phát hiện *str*A và *str*B là 22,5%, *aad*A2 là 31,2%, *aad*B là 37,7%. Điều này cho thấy có sự khác nhau đáng kể trong mối liên quan giữa kiểu hình với kiểu gen kháng STR và GN (Bảng 3.20). Mặc dù STR là một trong những kháng sinh được sử dụng nhiều trong chăn nuôi và được giám sát chặt chẽ bởi hệ thống giám sát vi khuẩn kháng kháng sinh Hoa Kỳ (NARMS). Ngược lại, trong các kiểu hình kháng, tỷ lệ không phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình ở kháng sinh GN lại rất thấp. Kết quả này tương tự với nhóm tác giả McDermott và ctv (2016), theo đó, GN cũng là kháng sinh có tỷ lệ không phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình cao ở các mẫu. Tất cả những kết quả khác

nhau này có thể được lý giải là do mối quan hệ giữa kiểu hình kháng và sự biểu hiện của gen kháng kháng sinh không phải luôn luôn đúng.



Hình 3.7. Kết quả xác định gen *str*A, *str*B mã hóa kháng aminoglycoside

Chú thích: M: Thang chuẩn 100bp plus; NC: Chứng âm; PC: Chứng dương [a: strA (608 bp), b: strB (256 bp)]; 1-21: các mẫu khảo sát



Hình 3.8. Kết quả xác định gen *aad*A2, *aad*B mã hóa kháng aminoglycoside

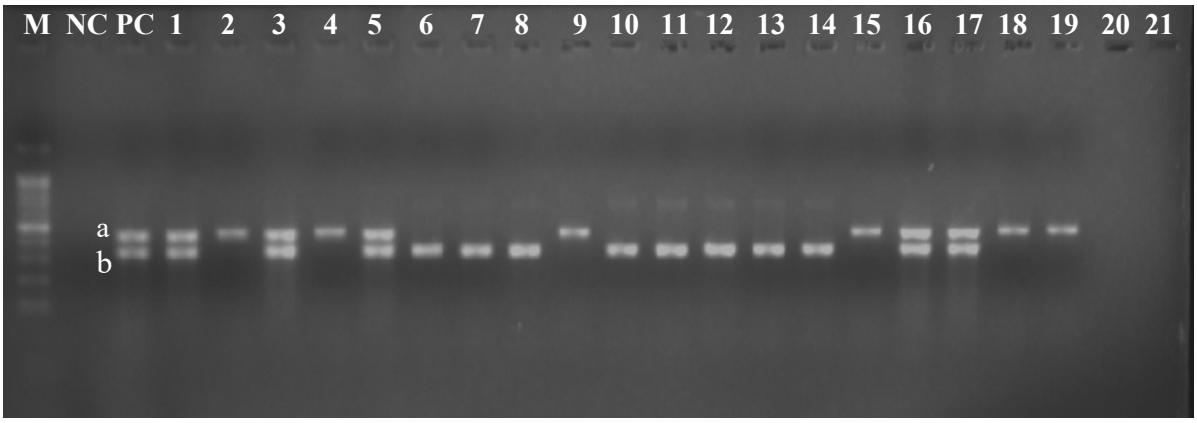
Chú thích: M: Thang chuẩn 100bp plus; NC: Chứng âm; PC: Chứng dương [a: aadA2 (512 bp), b: aadB (219 bp)]; 1-21: các mẫu khảo sát

Ngoài ra, có thể là do có nhiều cơ chế kháng cùng tham gia kháng một loại kháng sinh. Có nhiều cơ chế kháng ở *Salmonella*, bao gồm sản xuất enzyme để bất hoạt kháng sinh, giảm tính thấm của màng tế bào, hoạt động của hệ thống bơm ngược thải kháng sinh và thay đổi mục tiêu tác dụng của kháng sinh. Các gen kháng có thể được truyền ngang giữa các vi khuẩn thông qua biến nạp, tải nạp và tiếp hợp. Một số lượng lớn các gen có liên quan đến những con đường này và liên quan đến điều hòa biểu hiện gen. Trong một số trường hợp, sự biểu hiện của gen kháng có thể không

liên quan đến kiểu hình kháng (Zou và ctv, 2009). Ngoài ra, sự không phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình có thể là do các cơ chế kháng khác chưa được tìm ra. Sự không phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình trong trường hợp này có thể giải thích là do các gen kháng biểu hiện ở mức độ chưa đủ. Điều này làm vi khuẩn không có khả năng kháng kháng sinh (Andres và ctv, 2013). Với việc phân tích kết quả trực tiếp trên serovar phân lập được thì có thể kiểu hình kháng do nhiều kiểu gen qui định và không giống với những gì các tác giả khác kết luận.

3.13 Sự hiện diện gen kháng nhóm sulfonamide

Trong số 21 serovar thì chỉ có 05 chủng mang cả hai gen (*sul*1, *sul*2) cùng lúc tỷ lệ 23,81%. Đối với gen *sul*1 thì hiện diện 13/21 chủng (61,90%), *sul*2 thấp hơn *sul*1 với tỷ lệ 52,38%. Serovar mang nhiều gen *sul*1 là Kentucky với tỷ lệ 38,46%, Infantis với 30,77%; *sul*2 là Kentucky với tỷ lệ 45,45% (Hình 3.9).



Hình 3.9. Kết quả xác định gen *sul*1, *sul*2 mã hóa kháng sulfonamide

Chú thích: M: Thang chuẩn 100bp plus; NC: Chứng âm; PC: Chứng dương [a: sul2 (435 bp), b: sul1 (331 bp)]; 1-21: các mẫu khảo sát.

Kết quả Bảng 3.20 cũng cho thấy các gen kháng sulfonamide phổ biến ở nghiên cứu này là *sul*1. Ở *Salmonella*, kháng sulfonamid thường do các gen *sul* chịu trách nhiệm. Gen *sul*1 nằm trên các yếu tố di truyền chuyển vị, chẳng hạn như integron 1 hoặc nằm trên plasmid. Những gen này có vị trí gần với *sul*1 và *sul*3 trong một integron, nằm trên plasmid, hoặc nằm trên các đảo gây bệnh của hệ gen ở *Salmonella* (Antunes và ctv, 2006). Chúng tôi phát hiện một số serovar *Salmnella* nhiễm kép 2 gen (*sul*1, *sul*2) hoặc kết hợp giữa integron 1 với các gen *sul*1 và *sul*2. Tuy nhiên, vẫn

có trường hợp kiểu hình kháng không phù hợp với kiểu gen kháng, cụ thể các serovar SA11/19 3497, SA06/20 1809 và SA08/20 2058 mặc dù có mang gen *sul*1,2 nhưng lại nhạy với SXT. Trường hợp này có thể do mức độ điều hòa hoạt động của các gen *sul* bị ức chế bởi một tác nhân nào đó hoặc ưu tiên sự biểu hiện cho các gen cassette khác đã được chèn vào integron trước đó. Khả năng kháng khác nhau trong cùng một nhóm có thể được quy định từ nhiều gen khác nhau chứ không nhất thiết chỉ tập trung vào một vài gen cụ thể nào đó.

Bảng 3.20. Sự hiện diện gen kháng nhóm aminoglycoside và sulfonamide

Nguồn	Ký hiệu	Serovar	Kiểu hình kháng kháng sinh	*str*A	*str*B	*aad*A2	*aad*B	*sul*1	*sul*2
Thịt heo	SA11/19 3497	*S.* Kentucky	AMC/AM-C-NA/CIP/OFX-STR-TE	+	-	+	+	+	+
	SA11/19 4221	*S.* Indiana	CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	-	-	-	-
Thịt bò	SA07/20 3335	*S.* Infantis	AM-C-NA/CIP/OFX-STR-SXT	-	-	+	-	+	-
Thịt gà	SA11/19 3498	*S.* Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	+	-	-	-	-	+
	SA12/19 1584	*S.* Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	-	+	-
	SA05/20 1114	*S.* Potsdam	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	+	-	-	-	-	+
	SA07/20 1066	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	-	+	-
	SA07/20 1067	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	-	-	+	-	+	-
Cá	SA11/19 3514	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	-	-	-	+
	SA11/19 3515	*S.* Saintpaul	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	+	-	+	-	+	+
	SA11/19 4205	*S.* Braenderup	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	-	-	+	-	+	+
	SA12/19 501	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	+	-	+	+
	SA12/19 1600	*S.* Kentucky	AM-CAZ-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	-	-	+	-	+	-
	SA01/20 66	*S.* Potsdam	AM-NA/CIP-STR/GM-TE-SXT	+	-	+	-	-	+
	SA02/20 1524	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	+	-	-	+
	SA05/20 210	*S.* Infantis	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	-	-	+	-	+	-
	SA06/20 1808	*S.* Agona	AMC/AM-CAZ-C-STR-TE-SXT	-	-	+	-	-	-

SA06/20 1809	*S.* Infantis	AM-C-NA/CIP-STR/GM-TE	-	-	-	-	+	-
SA07/20 460	OMF:1,z_6:UT	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE-SXT	+	-	+	-	+	+
SA07/20 462	7:1,z_6:UT	AM-C-NA-STR/GM-TE-SXT	-	-	-	-	+	-
SA08/20 2058	*S.* Kentucky	AM-C-NA/CIP/OFX-STR/GM-TE	+	-	+	-	-	+

3.14 Phân tích mối quan hệ các nhóm gen kháng với cơ chế đa kháng của *Salmonella*

Để thực hiện phân tích các nhóm gen kháng ở *Salmonella* liên quan đến cơ chế đa kháng, một số serovar đa kháng đã được lựa chọn để giải trình tự toàn bộ hệ gen. Tuy nhiên, trong khuôn khổ của luận án này, chúng tôi chỉ lựa chọn 04 chủng theo tiêu chí cùng một loại serovar, kháng nhiều kháng sinh và theo nguồn phân lập, gồm *S.* Kentucky SA11/19 3497, *S.* Kentucky SA12/19 1600, *S.* Kentucky SA07/20 1066, *S.* Kentucky SA07/20 1067. Các chủng trên được thực hiện giải trình tự toàn bộ hệ gen tại Công ty TNHH Khoa Học KTEST.

3.14.1 Đánh giá chất lượng giải trình tự

Tổng số trình tự (reads) sau khi giải trình tự được ở cả 2 mạch, sẽ được loại bỏ các thành phần adapter hoặc các vị trí mang các nucleotide chất lượng thấp bằng công cụ Fastp. Kết quả chất lượng mẫu sau khi tinh sạch được trình bày ở Bảng 3.21.

Bảng 3.21. Chất lượng giải trình tự của serovar

Ký hiệu	Tổng số read	Tổng số base (bp)	%GC	Chiều dài	Q20 (%)	Q30 (%)
SA11/19 3497	4.517.642	679.459.738	53,04	31-151	97,01	95,94
SA12/19 1600	5.093.950	766.023.490	53,04	31-151	97,28	96,27
SA07/20 1066	5.081.006	763.823.726	52,87	31-151	96,79	95,65
SA07/20 1067	5.830.852	876.973.197	52,87	31-151	97,35	96,36

Dữ liệu sau khi tinh sạch sẽ được phân loại taxonomy nhằm đánh giá nguồn gốc của vi sinh vật trong mẫu. Cơ sở dữ liệu sử dụng bao gồm các trình tự từ người, vi khuẩn, vi khuẩn cổ, virus, một số nấm và một số động vật nguyên sinh nhỏ.

3.14.2 Lắp ráp de novo và xác định nguồn gốc contigs

Lắp ráp de novo là một phương pháp xây dựng bộ gen từ một số lượng lớn các đoạn DNA (ngắn hoặc dài) mà không cần biết trước về trình tự hoặc trật tự chính xác của các đoạn đó. Phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng công cụ Unicycler v0.4.7 để sắp xếp de novo.

Các vùng trình tự lặp lại có độ phủ sâu thấp gây khó khăn trong lắp ráp genome, kết quả lắp ráp thường là một số lượng các contigs rời rạc thay vì chỉ một đại diện cho genome. Chúng tôi sử dụng BLASTn với cơ sở dữ liệu cho phép xác định kết quả tương đồng giữa các contigs sau lắp ráp với cơ sở dữ liệu trên thế giới. Chúng tôi chỉ chọn những kết quả có độ tương đồng cao nhất từ các kết quả BLAST. Sau đó chọn ra chủng tham chiếu có độ tương đồng cao với mẫu phân lập. Các serovar SA12/19 1600; SA11/19 3497; SA07/20 1066; SA07/20 1067 được so sánh với chủng tham chiếu có mã số là CP043667.1 (Phụ lục B7, B8, B9, B10). Trình tự hoàn chỉnh của chủng tham chiếu gần nhất được sử dụng để định hướng các contigs sau lắp ráp sử dụng chương trình sắp gióng cột bộ gen MAUVE, LASTZ và phần mềm Geneious.

3.14.3 Kết quả giải trình tự nhiều locus (MLST) và xác định serotype

MLST được xác định dựa trên phần mềm MLST 2.0. Các contigs sẽ được so sánh với các gen "giữ nhà" lưu trữ từ cơ sở dữ liệu pubmlst.org để xác định kiểu alen và mã số ST (Sequence type). Nếu trình tự các gen "giữ nhà" giống với các trình tự được lưu trữ, kết quả mã ST được cấp cho chủng có tổ hợp alen các gen "giữ nhà" trùng khớp với mẫu phân tích. Serotype của chủng được xác định dựa trên phần mềm SeqSero2. So sánh với kết quả được thực hiện bằng phương pháp truyền thống, kết quả xác định serotype bằng kỹ thuật giải trình tự hoàn toàn trùng khớp và được trình bày tại Bảng 3.22.

Bảng 3.22. Kết quả xác định serotype của chủng phân lập

Ký hiệu chủng	Công thức kháng nguyên			Công thức	Serovar
	Kháng nguyên O	Kháng nguyên H			
		Pha 1	Pha 2		
SA12/19 1600	8	i	1,z_6	8:i:1,z6	*S.* Kentucky
SA11/19 3497					
SA07/20 1066					
SA07/20 1067					

3.14.4 Phân tích nhóm gen kháng liên quan yếu tố di truyền di động

Phân tích kết quả thu nhận được, chúng tôi phát hiện được các integron ở cả bốn serovar nhưng chủ yếu là nhóm 1 (*IntI*1). Integron là phương tiện và con đường để chuyển gen giữa các vi khuẩn. Integron gồm có ba phần là: (1) gen mã hoá enzyme tái tổ hợp tyrosine (integrase, được mã hoá bởi gen *intI*), cần thiết cho sự tích hợp đặc hiệu trong integron. (2) vị trí tích hợp nằm sát *intI*, *attI*, vùng này được nhận diện bởi integrase. Và (3) promoter (Pc), nằm ở cuối *int*, cần thiết cho phiên mã và biểu hiện các gen trong cassette (Xu và ctv, 2011). Integron còn có khả năng mang, bắt giữ và chuyển đổi các gen cassette (Jacquier và ctv, 2009) và là nơi thể hiện tính năng của gen cassette. Một integron có thể mang 10 gen cassette, đặc biệt có integron chứa 100 gen cassette gọi là siêu integron. Gen cassette cũng là một yếu tố di truyền có khả năng di chuyển, gắn vào hay rời ra khỏi integron, tính năng của gen cassette thường là mã hóa sự kháng kháng sinh, tính năng này chỉ được thể hiện khi gen cassette gắn vào integron, khi nó ở trạng thái tự do thì không có tính năng này. Các gen cassette đóng vai trò quan trọng, là cơ sở chính làm lan truyền tính kháng kháng sinh hiện nay (Guerin và ctv, 2009), xác định sự hiện diện của integron và gen cassette ở các serovar *Salmonella* là cần thiết để chúng ta quan tâm hơn nữa về dùng kháng sinh trong chăn nuôi và điều trị.

Các integron nhóm 1 được xác định trên contigs vị trí 17 đối với SA12/19 3497; contigs vị trí 20, 39, 40 đối với SA12/19 1600; contigs vị trí 19, 37, 38 đối với SA07/20 1066 và 1067. Các vùng integron trên mỗi contigs được chú giải tại phụ lục B11, B12, B13. Trong đó, tại vị trí integron trên contig 17, 19, 20 chứa các gen *tet, aad*A, *sul*1 có vai trò kháng kháng sinh nhóm tetracyline, aminoglycoside và sulfonamide. Integron trên contigs 37 và 39 chỉ mang hai gen *lnu*F/*lnu*G và *aad*A mã hóa nucleotidyltransferase kháng kháng sinh nhóm lincosamide và aminoglycoside. Kháng sinh thuộc nhóm lincosamid có phổ kháng khuẩn tương tự như kháng sinh nhóm macrolid. Có tác dụng trên *S. aureus*, nhưng không có hiệu quả trên *S. aureus* kháng methicilin và ít có tác dụng trên trực khuẩn, gram âm, hiếu khí. Điều này cho thấy có khả năng việc lựa chọn cũng như phối hợp kháng sinh chưa thật sự hiệu quả

trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản. Vì vậy, có thể nhận định các serovar SA12/19 1600, SA07/20 1066 và SA07/20 1067 thu nhận gen *lnu*F/*lnu*G kháng lincosamid từ các loài khác là rất lớn. Integron trên contigs 38 và 40 mang gen *dhfr* mã hóa dihydrofolate reductase kháng TMP, gen *cml*A kháng C, gen *arr* mã hóa ADP ribosyl transferase kháng RA. Kháng sinh RA được xem là thế hệ mới thuộc nhóm macrolide, kháng sinh phổ kháng rộng, chuyên dùng trong thủy sản chủ yếu là tôm và cá, có tác dụng đối với cả hai vi khuẩn Gram âm và dương. Bên cạnh đó, serovar SA12/19 1600 được phân lập từ mẫu cá nên việc thu nhận các gen kháng ngoại lai từ môi trường nuôi trồng thủy sản là điều rất đáng quan tâm. Kết quả phân tích và xác định cấu trúc integron 1 của bốn serovar cho thấy chúng mang đồng thời nhiều gen kháng kháng sinh, điều này hoàn toàn phù hợp với kiểu hình đa kháng đã được xác định. Bên cạnh đó, chúng tôi còn ghi nhận tính đa kháng của bốn serovar có liên quan đến yếu tố di truyền chuyển vị là *Tn*21 mã hóa *Urf*2 hiện nay chưa có công trình nghiên cứu nào cho biết hay mô tả chi tiết chức năng hoạt động của chúng.

3.14.5 Phân tích các nhóm gen kháng kháng sinh của *Salmonella*

Các nhóm gen kháng kháng sinh có trong trình tự de novo của bốn chủng nghiên cứu được xác định từ kết quả chú giải hệ gen và các chương trình thuật toán Kmer-Search, BLAT trong hệ thống phân tích PATRIC. Kết quả tóm tắt các gen kháng và kiểu hình kháng kháng sinh được trình bày trong Bảng 3.23. Trong tổng số 44 kiểu hình được tạo ra từ kết quả kháng sinh đồ. Có 38 kiểu hình kháng có biểu hiện của các gen kháng. Có 06 kiểu hình nhạy với kháng sinh nhưng đều có biểu hiện của gen kháng. Như vậy, sự phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình là 86,36% (38/44) và không phù hợp là 13,64% (06/44). Tỷ lệ kiểu hình kháng trùng khớp với kiểu gen của chúng tôi có phần cao hơn so với kết quả của Nguyễn Thanh Việt và ctv (2018), cho biết tỷ lệ phù hợp giữa kiểu gen với kiểu hình ở các chủng *Salmonella* là 71,4%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với các kết quả của một số tác giả khác như McDermott và ctv (2016) (99%) và Zankari và ctv (2013) (99,74%). Mặc dù có sự phù hợp cao giữa kiểu gen và kiểu hình, tuy nhiên còn một tỷ lệ lớn (13,64%) kiểu gen và kiểu hình không phù hợp nhau. Trong đó, đáng chú ý chủng SA11/19 3497 có

hiện diện kiểu gen kháng SXT (*sul*1*, sul*2*, fol*A*, dhfr*14) nhưng kiểu hình lại nhạy với kháng sinh này. Tiếp theo GN thuộc nhóm aminoglycoside có kiểu hình nhạy nhưng lại có biểu hiện các gen (*aac*(6')-*Iaa*, *aac*6-*Iaa*, *aph*(6)-*Id*, *aph*(3")-*Ib*) kháng kháng sinh nhóm này. Sự không phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình trong luận án này có thể là do có nhiều cơ chế cùng tham gia kháng một loại kháng sinh. Điều này làm vi khuẩn vẫn còn khả năng nhạy với một vài kháng sinh (Andres và ctv, 2013). Tuy nhiên, để giải thích vấn đề này, nhận định của chúng tôi thiên về hiện tượng ức chế gen sau phiên mã dẫn đến các gen kháng rơi vào trạng thái "câm lặng". Cho đến ngày nay, các nhà khoa vẫn tiếp tục tìm hiểu về hiện tượng câm gen trên nhiều đối tượng khác nhau nhằm tìm hiểu và làm sáng tỏ một cách chi tiết cơ chế của RNAi. Kết quả nghiên này cung cấp thêm thông tin để hiểu rõ bản chất của cơ chế này nhằm ứng dụng kỹ thuật câm gen vào việc xác định chức năng kháng của các gen trong các bộ di truyền của sinh vật.

Các gen kháng kháng sinh có thể được truyền ngang giữa các vi khuẩn thông qua biến nạp, tải nạp và tiếp hợp. Một số lượng lớn các gen còn liên quan đến điều hòa biểu hiện gen. Trong một số trường hợp, sự biểu hiện của gen kháng có thể không liên quan đến kiểu hình kháng (Zou và ctv, 2009). Mặt khác, sự không phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình có thể là do các cơ chế kháng mới chưa được phát hiện. Việc tìm ra cơ chế kháng mới ở vi khuẩn còn nhiều hạn chế vì hầu hết các nghiên cứu đều tập trung vào nuôi cấy vi khuẩn và tìm các gen kháng đã biết trước thông qua các kỹ thuật sinh học phân tử như PCR. Cách tiếp cận này làm cho chúng ta hiểu biết chưa đầy đủ về hệ gen kháng kháng sinh ở vi khuẩn (Martiny và ctv, 2011).

Kết quả của chúng tôi cho thấy sự phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình của các kháng sinh thuộc nhóm phenicol, aminoglycoside và tetracycline có tỷ lệ cao nhất. Đối với CAZ thuộc nhóm cephalosporin thế hệ thứ 3 thường được chỉ định dùng trong những bệnh nhiễm khuẩn nặng mà kháng sinh thông thường không tác dụng thì chỉ có SA11/19 3497 còn nhạy với chúng và có kiểu hình khớp với kiểu gen. Tuy nhiên, ba serovar còn lại SA12/19 1600, SA07/20 1066, SA07/20 1067 đều kháng kháng sinh này và có kiểu gen tương ứng khi giải trình tự. Điều này cho thấy việc

giám sát tình hình sử dụng loại kháng sinh này là rất cần thiết và tuy cùng một serovar nhưng nguồn phân lập khác nhau có thể dẫn đến tính kháng về số lượng cũng như chủng loại kháng sinh là khác nhau. Hơn thế nữa, kết quả giải trình tự hệ gen cũng có sự hiện diện hầu hết các gen có khả năng mã hóa kháng lại các loại kháng sinh của các nhóm này với tỷ lệ tương đồng cao. Tuy nhiên, sự có mặt của gen kháng không có nghĩa là chúng sẽ biểu hiện, hoặc biểu hiện đủ mạnh để tạo ra kiểu hình kháng. Sự biểu hiện của các gen kháng ở kiểu hình nhạy kháng sinh từ kết quả này là một minh chứng. Giải trình tự thế hệ mới còn có một ưu điểm: đây là phương pháp khả thi cho mục đích giám sát các gen kháng kháng sinh ở vi khuẩn (Zankari và ctv, 2013).

Bảng 3.23. Số lượng các gen và kiểu hình kháng kháng sinh của *Salmonella*

Nhóm	Kháng sinh	Ký hiệu (Kiểu hình/nhóm gen kháng kháng sinh)			
		SA11/19 3497	**SA12/19 1600**	**SA07/20 1066**	**SA07/20 1067**
β-lactam	**AMC**	**(R)** *bla*TEM-1 *bla*TEM family	**(S)** *bla*CTX-M-55 *bla*CTX-M family	**(S)** *bla*CTX-M-55 *bla*CTX-M family	**(S)** *bla*CTX-M-55 *bla*CTX-M family
	AMP	**(R)** *bla*TEM-1 *bla*TEM family	**(R)** *bla*CTX-M-55 *bla*CTX-M family	**(R)** *bla*CTX-M-55 *bla*CTX-M family	**(R)** *bla*CTX-M-55 *bla*CTX-M family
	CAZ	**(S)** *bla*TEM-1 *bla*TEM family	**(R)** *bla*CTX-M-55 *bla*CTX-M family	**(R)** *bla*CTX-M-55 *bla*CTX-M family	**(R)** *bla*CTX-M-55 *bla*CTX-M family
Phenicol	**C**	**(R)** *floR* family	**(R)** *cmlA* family; *floR* family	**(R)** *cmlA* family; *floR* family	**(R)** *cmlA* family; *floR* family
Quinolone	**NA**	**(R)** *gyrA; gyrB; parC; parE*	**(R)** *gyrA; gyrB; parC; parE; mdtK/norM* (MATE family)	**(R)** *gyrA; gyrB; parC; parE; mdtK/norM* (MATE family)	**(R)** *gyrA; gyrB; parC; parE; mdtK/norM* (MATE family)
	CIP	**(R)**	**(R)**	**(R)**	**(R)**

		gyrA, gyrB, parC, parE	*gyrA, gyrB, parC, parE; mdtK/norM* (MATE family)	*gyrA, gyrB, parC, parE; mdtK/norM* (MATE family)	*gyrA, gyrB, parC, parE; mdtK/norM* (MATE family)
	OFX	**(R)** *gyrA, gyrB, parC, parE*	**(R)** *gyrA, gyrB, parC, parE; mdtK/norM* (MATE family)	**(R)** *gyrA, gyrB, parC, parE; mdtK/norM* (MATE family)	**(R)** *gyrA, gyrB, parC, parE; mdtK/norM* (MATE family)
Aminoglycoside	**GM**	**(S)** *aac(3)-I; aac(3)-Id; aac(6')-Iaa; aac(6')-Ic,f,g,h,j,k,l,r-z; aph(3'')-I; aph(3'')-Ib; aph(6)-Id; aph(6)-Ic/aph(6)-Id; aph(3'')-Ib; aadA7 (aadA family); kdpE; acrD (AcrAD-TolC)* (RND type)	**(R)** *aac(3)-I; aac(3)-Id; ac(3)-IIa; aac(3)-II,III,IV,VI,VIII,IX,X; aac(6')-Iaa; aac(6')-Ic,f,g,h,j,k,l,r-z; aph(3')-I; aph(3'')-I; aph(3'')-Ia; aadA7 (aadA family); acrD (AcrAD-TolC)* (RND type)	**(R)** *aac(3)-I; aac(3)-Id; aac(3)-IIa; AAC(3)-II,III,IV,VI,VIII,IX,X; aac(6')-Iaa; aac(6')-Ic,f,g,h,j,k,l,r-z; aph(3')-I; aph(3')-Ia; aadA7 (aadA family); acrD (AcrAD-TolC)* (RND type)	**(R)** *aac(3)-I; aac(3)-Id; aac(3)-IIa; aac(3)-II,III,IV,VI,VIII,IX,X; aac(6')-Iaa; aac(6')-Ic,f,g,h,j,k,l,r-z; aph(3')-I; aph(3')-Ia; aadA7 (aadA family); acrD (AcrAD-TolC)* (RND type)
	STR	**(R)**	**(R)**	**(R)**	**(R)**

		aac(3)-I; aac(3)-Id; aac(6')-Iaa; aac(6')-Ic,f,g,h,j,k,l,r-z; aph(3'')-I; aph(3'')-Ib; aph(6)-Id; aph(6)-Ic/aph(6)-Id; aph(3'')-Ib; aadA7 (aadA family); kdpE; acrD (AcrAD-TolC (RND type)	*aac(3)-I; aac(3)-Id; ac(3)-IIa; aac(3)-II,III,IV,VI,VIII,IX,X; aac(6')-Iaa; aac(6')-Ic,f,g,h,j,k,l,r-z; aph(3')-I; aph(3'')-I; aph(3'')-Ia; aadA7 (aadA family); acrD (AcrAD-TolC)* (RND type)	*aac(3)-I; aac(3)-Id; aac(3)-IIa; AAC(3)-II,III,IV,VI,VIII,IX,X; aac(6')-Iaa; aac(6')-Ic,f,g,h,j,k,l,r-z; aph(3')-I; aph(3')-Ia; aadA7 (aadA family); acrD (AcrAD-TolC)* (RND type)	*aac(3)-I; aac(3)-Id; aac(3)-IIa; aac(3)-II,III,IV,VI,VIII,IX,X; aac(6')-Iaa; aac(6')-Ic,f,g,h,j,k,l,r-z; aph(3')-I; aph(3')-Ia; aadA7 (aadA family); acrD (AcrAD-TolC)* (RND type)
Tetracycline	**TE**	**(R)** *tetC, tetA*	**(R)** *tetC, tetA*	**(R)** *tetC, tetA, tetR*	**(R)** *tetC, tetA, tetR*
Sulfonamide/ trimethoprim	**SXT**	**(S)** *sul1, sul2, folA, dhfr14*	**(R)** *sul1, sul2, folA, dhfrA14*	**(R)** *sul1, sul2, folA, dhfrA14*	**(R)** *sul1, sul2, folA, dhfrA14*
Khác		*mph(A)* family; *mrx*; *arr-2*; *uhpT*; *glpT*; *lnu(F)/lnu(G)*; *linG*; *pmrF*; *bacA; SugE, BcrC, MarB; MarR; MarA; QacE*			

3.14.5.1 Nhóm gen liên quan đến kháng nhóm β-lactam

Gen kháng nhóm β-lactam được phát hiện chủ yếu *bla*TEM-1 và *bla*CTX-M-55. Riêng *bla*TEM-1 chỉ phát hiện ở SA11/19 3497, *bla*CTX-M-55 hiện diện ở ba serovar SA12/19 1600, SA07/20 1066, SA07/20 1067. Cả bốn serovar phân lập đều kháng AMP và đều biểu hiện gen kháng. Đối với AX phối hợp với axit clavulanic giúp cho không bị β-lactamase phá huỷ, xét về kiểu hình chỉ có SA11/19 3497 kháng loại kháng sinh này và kết quả giải trình tự hệ gen cũng có hiện diện gen *bla*TEM-1. Theo Güerri và ctv (2004) cho biết các enzym thường xuyên liên quan đến kháng AX thường được mã hóa bởi gen *bla*TEM-1. Trong 2 thập kỷ qua, *bla*CTX-M đã nhanh chóng lan rộng khắp thế giới và 133 loại *bla*CTX-M khác nhau hiện đã được công nhận (Jacoby, 2009). Trong đó, *bla*CTX-M-55 lần đầu tiên được công bố ở *E. coli* và *Klebsiella pneumoniae* sinh ESBL ở Thái Lan vào năm 2004 và 2005. Công trình đó báo cáo phân lập được 7 chủng mang *bla*CTX-M-55 (Kiratisin và ctv, 2007). Sau đó, nhiều báo cáo cho rằng các chủng phân lập thuộc Enterobacteriaceae đều có hiện diện gen *bla*CTX-M-55 ở cả người và động vật tại một số quốc gia trên thế giới (Sjölund-Karlsson và ctv, 2011). Gen *bla*CTX-M-55 khác với *bla*CTX-M-15 chỉ bởi một axit amin thay thế duy nhất (valin thay cho alanin) ở vị trí 80 (Ala80Val). Do đó, *bla*CTX-M-55 được xem có hoạt tính thủy phân tương tự như *bla*CTX-M-15 và thể hiện hiệu suất xúc tác tăng lên đối với CAZ cũng như CTX (Poirel và ctv, 2002). Các nghiên cứu trước đây còn cho rằng các chủng phân lập sinh *bla*CTX-M-55 thường cho thấy khả năng kháng CAZ cao (Kiratisin và ctv, 2007). Kết quả này cũng cho thấy ba serovar SA12/19 1600, SA07/20 1066, SA07/20 1067 có kiểu hình kháng CAZ và có hiện diện của gen *bla*CTX-M-55.

Enzzyme β-lactamase rất phổ biến ở *Salmonella*. Trong số các gen quy định tổng hợp enzyme này, gen *bla*TEM-1 và *bla*TEM-55 là các gen phổ biến nhất (Khan và ctv, 2012). Trong quá trình thực hiện, chúng tôi phát hiện được cả hai gen nhưng có sự phân bố khác nhau. Gen *bla*TEM-1 chỉ phát hiện ở SA11/19 3497 và gen *bla*CTX-M-55 phổ biến ở ba serovar còn lại SA12/19 1600, SA07/20 1066, SA07/20 1067. Tỷ lệ phù hợp giữa kiểu gen và kiểu hình là 100%. Ngoài ra, phản ứng PCR

dùng để phát hiện các gen kháng β-lactam phù hợp 100% với kết quả giải trình tự hệ gen của bốn serovar, trong đó đáng lưu ý là gen *bla*SHV hoàn toàn không hiện diện ở cả hai phương pháp. Quan trọng hơn, qua kết quả giải trình tự chúng tôi còn phát hiện có đột biến tại vị trí codon 90 (Asp90Gly) trên gen *bla*TEM của chủng SA11/19 3497. Ba chủng còn lại SA07/20 1066, SA07/20 1067 và SA12/19 1600 đột biến cũng xuất hiện tại vị trí codon 80 có sự thay thế Ala thành Val (Ala80Val). Điều này cho thấy khả năng kháng kháng sinh thuộc nhóm β-lactam của các *Salmonella* của luận án này có sự tham gia của nhiều cơ chế.

3.14.5.2 Nhóm gen liên quan đến kháng nhóm phenicol

Phenicol hoạt động bằng cách gắn vào peptidyltransferase của tiểu phần 50S ribosome, mục đích ngăn cản sự hình thành liên kết peptid giữa các axit amin. Đối với *Salmonella*, có nhiều gen tham gia kháng lại các kháng sinh nhóm này, bao gồm bất hoạt O-acetyltransferase (*cat1* và *cat2*), các gen thuộc hệ thống kênh bơm ngược thải kháng sinh (*cml*A, *cml*B, *flo*R) (Khan và ctv, 2012). Trong nghiên cứu này xét về kiểu hình cả bốn serovar đều kháng với C, nhưng kết quả PCR chỉ phát hiện gen *cml*A ở SA07/20 1066. Tuy nhiên, các gen *cml*A và *flo*R đều biểu hiện ở các serovar bằng kỹ thuật giải trình tự hệ gen (SA11/19 3497 chỉ phát hiện gen *flo*R), điều này hoàn toàn phù hợp với kiểu hình kháng đã được khảo sát và chứng tỏ chúng có vai trò trong việc kháng kháng sinh đối với nhóm phenicol.

3.14.5.3 Nhóm gen liên quan đến kháng nhóm quinolon

Cơ chế kháng quinolone đã được mô tả và đặc trưng ở nhiều loại vi khuẩn (Hooper, 1999). Những đột biến này chủ yếu liên quan đến thay đổi axit amin tại các vùng xác định kháng quinolon QRDR trong các tiểu đơn vị cấu thành topoisomerase II (*gyr*A, *gyr*B) và IV (*par*C, *par*E), có liên quan đến quá trình sao chép DNA, tái tổ hợp, phiên mã và phân chia của nhiễm sắc thể đã sao chép (Hooper, 1999). Hầu hết các vi khuẩn kháng quinolon đều có đột biến tại QRDRs của cả *gyr*A và *par*C. Ngoài ra, một cơ chế mới kháng quinolon là qua trung gian plasmid PMQR đã được báo cáo liên quan đến việc bảo vệ DNA gyrase. Các công bố nhấn mạnh tầm quan trọng của PMQR giữa các vi khuẩn gây bệnh khác nhau có nguồn gốc từ thực phẩm (Martinez-

Martinez và ctv, 2003). Ngoài ra, sự tham gia của nhiều cơ chế bơm thải và sự hiện diện của gen mới, aac (6')-Ib-cr mã hóa một enzym điều chỉnh fluoroquinolne (aminoglycoside acetyltransferase) đã được phát hiện trong nhiều vi khuẩn đường ruột (Machado và ctv, 2006). Chúng tôi ghi nhận tỷ lệ serovar có kiểu hình kháng cao nhất là các kháng sinh thuộc nhóm quinolon. Điều này hoàn toàn trái ngược với các serovar được phân lập từ phía Bắc của nhóm tác giả Nguyễn Thanh Việt và ctv (2018). Nhóm này cho biết CIP là kháng sinh ít bị kháng nhất, chỉ có duy nhất một serovar là kháng CIP. Chúng tôi đã phát hiện các gen kháng phổ biến là *gyr*A, *gyr*B, *par*C và *par*E hiện diện 100% ở các serovar. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả PCR đã khảo sát ở các phần trước. Quan trọng hơn, kết quả của luận án còn phát hiện có đột biến ở *gyr*A và *par*C ở cả 4 serovar. Cụ thể, đột biến trên gen *gyr*A tại codon 83 có sự thay thế Ser thành Phe (Ser83Phe) và codon 87 thay thế Asp thành Asn (Asp87Asn). Đối với *par*C phát hiện đột biến tại codon 57, 80, 395, 469 và 620 sự thay thế lần lượt như sau Thr57Ser, Ser80Ile, Ser395Asn, Ala469Ser, Thr620Ala. Không có đột biến nào được tìm thấy trong các gen *gyr*B và *par*E. Theo công bố của Park và ctv (2019), tất cả 10 serovar *S.* Kentucky phân lập có kiểu hình kháng CIP được phát hiện có đột biến ở *gyr*A và *par*C. Tám chủng đều có đột biến kép giống hệt nhau ở *gyr*A và *par*C (Ser83Phe; Asp87Asn ở *gyr*A và Thr57Ser; Ser80Ile ở *par*C). Ngoại trừ hai chủng có sự thay thế Tyr thành Asp trong *gyr*A tại codon 87 (Tyr87Asp). Một nghiên cứu khác cũng phát hiện đột biến kép tại *gyr*A (Ser83Phe và Asp87Gly) và *par*C (Ser80Arg) của serovar *S.* Kentucky (Song và ctv, 2018). Qua đó, cho thấy đột biến tại *gyr*A và *par*C xuất hiện với tần suất cao hơn *gyr*B và *par*E. Đối với *gyr*A đột biến thường xảy tại hai vị trí 83 và 87, tuy nhiên loại axit amin được thay thế của các serovar là rất đa dạng do bởi vị trí, địa lý và nguồn phân lập khác nhau. Đối với *par*C các serovar của luận án có số điểm đột biến nhiều hơn so với các công trình đã được công bố. Điều này, minh chứng cho việc vì sao tỷ lệ kháng kháng sinh thuộc nhóm quinolon rất cao của các chủng *Salmonella* phân lập được đã trình bày ở các phần trước.

Ngoài ra, chúng tôi còn phát hiện gen *mdt*K liên quan đến kênh bơm ngược thải kháng sinh MdtK/NorM thuộc họ MATE, biểu hiện ở 3/4 (75,0%) số lượng serovar. Như vậy, các gen này có thể tham gia vào cơ chế kháng kháng sinh thuộc nhóm quinolon ở bốn serovar. Hiện tượng kháng kháng sinh thuộc nhóm quinolon còn được các công trình nghiên cứu khác chỉ ra vai trò của gen *qnr* mã hóa các đoạn pentapeptide lặp lại có nhiệm vụ bảo vệ các enzyme DNA gyrase và topoisomerase IV kháng quinolone và nằm trên plasmid. Tuy nhiên, kết quả thu được trong luận án này hoàn toàn không phát hiện các gen *qnr* có vai trò kháng kháng sinh thuộc nhóm quinolon. Điều này cho thấy các serovar *Salmonella* phân lập được trong luận án này mang gen kháng quinolone thuộc nhóm khác. Vì vậy, việc tìm hiểu sâu hơn về cơ chế kháng kháng sinh nhóm quinolon bởi gen *qnr* của *Salmonella* phân lập từ thực phẩm, đặc biệt là serovar Kentucky là điều cần thiết trong giai đoạn hiện nay.

3.14.5.4 Nhóm gen liên quan đến kháng nhóm aminoglycoside

Các kháng sinh thuộc nhóm aminoglycoside là một trong những kháng sinh phổ rộng được sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản. Chúng hoạt động bằng cách liên kết với tiểu đơn vị 30S ribosomal của vi khuẩn (một số liên kết với tiểu đơn vị 50S), ức chế sự di chuyển của peptidyl-tRNA từ vị trí A sang vị trí P, làm vi khuẩn không thể tổng hợp protein thiết yếu cho sự phát triển của chúng. Các loại kháng sinh nhóm aminoglycoside khác nhau liên kết với các vị trí khác nhau trên rRNA, tùy thuộc vào cấu trúc của kháng sinh. Sự thay đổi cấu trúc của aminoglycoside dẫn đến giảm đáng kể khả năng kháng sinh gắn kết với RNA. Ở vi khuẩn, khả năng kháng aminoglycoside thường là do acetyltransferase (Aac), nucleotidyltransferase (adenylyltransferases, Ant) và phosphotransferase (Aph) (Liu và Pop, 2009). Phân tích dữ liệu thu được, chúng tôi chỉ xác định được hai gen kháng kháng sinh tổng hợp enzyme thuộc hai nhóm trên đó là gen *aac (aac(3)-I; aac(3)-Id; aac(6')-Iaa; aac(6')-Ic,f,g,h,j,k,l,r-z)* và *aph (aph(3'')-I; aph(3'')-Ib; aph(6)-Id; aph(6)-Ic/aph(6)-Id; aph(3'')-Ib)*. Ngoài ra, tất cả các serovar kháng STR từ kiểu hình đều có biểu hiện của gen kháng như *aad*A7 thuộc họ *aad*A, chứng tỏ các gen này có vai trò kháng STX và GN ở các serovar. Điều này đã được tác giả Garcia-Migura và

ctv (2012) nhận định. Theo đó, các gen *aad*A phổ biến trong các *Salmonella*. Tuy nhiên, với SA11/19 3497, các gen này không có tác dụng kháng GN. Với lý do là SA11/19 3497 có kiểu hình nhạy với kháng sinh này. Bên cạnh đó, chúng tôi còn phát hiện gen *acr*D mã hóa cho các hệ thống bơm ngược AcrAD-TolC (loại RND) ở tất cả các serovar. Riêng SA11/19 3497 chúng tôi còn phát hiện gen *kdp*E được biểu hiện nhưng cũng không liên quan gì đến vai trò kháng GN vì SA11/19 3497 hoàn toàn nhạy với GN. Mặt khác, tác giả Madsen và ctv (2000) công bố rằng *str*A và *str*B mới là các gen phổ biến ở *S.* Typhimurium. Tuy nhiên, kết quả giải trình tự, hai gen *str*A và *str*B hoàn toàn không biểu hiện ở 04 serovar. Điều này cho thấy rằng sự phổ biến của các gen kháng ở các serovar là khác nhau.

3.14.5.5 Nhóm gen liên quan đến kháng nhóm tetracycline

Tổng số hai gen kháng TE được phát hiện ở cả bốn serovar, bao gồm các gen *tet*A và *tet*C. Trong đó gen *tet*A, *tet*C mã hóa bơm ngược thải kháng sinh. Hầu hết các gen mã hóa kênh bơm ngược thải TE đều có khả năng kháng TE, nhưng ít hiệu quả hơn so với thế hệ thứ hai là doxycycline và minocycline và ít gây kháng hoặc không kháng thế hệ thứ ba, chẳng hạn như tigecycline (Chopra và ctv, 2001). Kết luận này cho thấy *tet*A và *tet*C ở các serovar đều có vai trò trong kháng TE. Ngoài các gen mã hóa kênh bơm ngược thải kháng sinh, kết quả của chúng tôi không phát hiện gen nào khác giúp *Salmonella* bảo vệ ribosome như *tet*M và *tet*S. Thêm vào đó, vi khuẩn điều hòa biểu hiện gen kháng bằng nhiều cách khác nhau, một trong những cách đó là sử dụng gen *tet*R, gen này mã hóa protein tetR. Khi không có mặt TE, protein tetR bám vào operator của tet operon gây ức chế phiên mã các gen kháng. Khi có mặt TE, kháng sinh này bám vào tetR làm protein này không bám được vào operator và quá trình phiên mã của các gen *tet* xảy ra làm kênh bơm ngược thải kháng sinh hoạt động, bơm TE ra khỏi tế bào (Nguyen và ctv, 2013).

Ngoài ra, kết quả khảo sát còn ghi nhận, gen *tet*R chỉ được phát hiện ở SA07/20 1066 và SA07/20 1067. Như vậy chứng tỏ SA11/19 3497 và SA12/19 1600 chỉ tồn tại một cơ chế kháng TE nhưng SA07/20 1066 và SA07/20 1067 tồn tại hai cơ chế kháng đối với kháng sinh này.

3.14.5.6 Nhóm gen liên quan đến kháng nhóm sulfonamide/trimethoprim

Các gen kháng mã hóa kháng SXT phổ biến ở nghiên cứu này là *sul*1*, sul*2*, fol*A và *dhfr*14 biểu hiện ở cả bốn serovar đều có kiểu hình kháng SXT. Ở *Salmonella*, kháng sulfonamid thường do các gen *sul* chịu trách nhiệm. Gen *sul*1 nằm trên các yếu tố di truyền chuyển vị, chẳng hạn như integron nhóm 1 hoặc nằm trên plasmid. Gen *sul*2 nằm trên plasmid. Nhiều gen kháng kháng sinh nhóm này được tìm thấy là *dhfr*. Những gen này có vị trí gần với *sul*1 và *sul*3 trong một integron, nằm trên plasmid, hoặc nằm trên các đảo gây bệnh của hệ gen *Salmonella* (Antunes và ctv, 2006). Điều này đã được chúng tôi chứng minh tại vị trí integron trên contig 20 có chứa gen *sul*1 có vai trò kháng kháng sinh nhóm sulfonamide và trên contigs 38 và 40 mang gen *dhfr* mã hóa dihydrofolate reductase kháng TMP. Ngoài ra, chúng tôi phát hiện được biểu hiện của cả các gen *sul* và *dhfr*, tuy nhiên, không phát hiện được biểu hiện của các gen *dfr*. Mặt khác, chúng tôi ghi nhận các gen *sul* và *dhfr* hoàn toàn không có tác dụng đối với SA11/19 3497 vì serovar này có kiểu hình nhạy với kháng sinh SXT.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

KẾT LUẬN

Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* là 16,84%. Các chủng *Salmonella* phân lập được có khả năng kháng cao với TE, AMP, STR, C và SXT (34,67%-52,00%). Ngược lại, 96,00% số chủng nhạy với CAZ. Định danh được 07 serovar đa kháng, *S.* Kentucky (8 chủng); *S.* Infantis (4 chủng); *S.* Agona và *S.* Potsdam (2 chủng); *S.* Saintpaul, *S*. Braenderup, *S.* Indiana (01 chủng); *OMF:1,z_6:UT* và *7:1,z_6:UT* (01 chủng).

Phát hiện 100% serovar *Salmonella* đa kháng mang integron 1, 3; integron 2 52,38%. Integron 1 chứa 08 vùng gen cassette (85,71%); integron 2 chứa 05 vùng gen cassette (72,73%). Và 100% serovar mang plasmid. *S*. Kentucky (08), *S*. Potsdam (07), *S*. Infantis, *S*. Saintpaul, *S*. Braenderup, *S*. Agona, 7:1,z_6:UT (05), OMF:1,z_6:UT, *S*. Indiana (04).

Xác định đột biến tại vị trí codon 90 (Asp90Gly) của gen *bla*TEM; codon 80 (Ala80Val) của gen *bla*CT; codon 83 và 87 (Ser83Phe; Asp87Asn) của gen *gyr*A; codon 57, 80, 395, 469 và 620 (Thr57Ser; Ser80Ile; Ser395Asn; Ala469Ser; Thr620Ala) của gen *par*C.

Ghi nhận tính đa kháng của *Salmonella enterica* sups. serovar Kentucky có liên quan đến yếu tố di truyền chuyển vị *Tn*21 mã hóa *Urf*2.

ĐỀ NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu chuyên sâu về vai trò của đột biến gen đến khả năng kháng kháng sinh nhóm tetracycline, aminoglycoside và quinolone.

Cần tiếp tục tìm hiểu cấu trúc và cơ chế hoạt động của các bơm ngược thải kháng sinh của *Salmonella*. Từ đó, phát triển các chất ức chế bơm ngược thải kháng sinh, góp phần quan trọng vào việc ngăn chặn và kiểm soát tình trạng đa kháng của *Salmonella* trong giai đoạn hiện nay.

Thực hiện các khảo sát nhằm làm rõ vai trò của các gen độc lực có ảnh hưởng, tác động đến chức năng kháng của các integron, vùng gen cassette và gen kháng của các chủng *Salmonella* đã phân lập từ thực phẩm.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. **Trương Huỳnh Anh Vũ, Nguyễn Hoàng Khuê Tú**, Huỳnh Yên Hà, Chu Vân Hải (2021). Đánh giá mức độ nhiễm và đặc điểm kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. phân lập từ thủy hải sản tươi sống tại các chợ truyền thống trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh. Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn Thực phẩm, tháng 03/2021.
http://vjfc.nifc.gov.vn/ajax/research/getfile?filecode=bb633744-efd6-43f9-a922-bc82d475dfe9

2. **Trương Huỳnh Anh Vũ, Nguyễn Hoàng Khuê Tú**, Huỳnh Yên Hà, Chu Vân Hải (2021). Thực trạng và đặc điểm kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. phân lập từ sản phẩm thịt tươi sống tại thành phố Hồ Chí Minh. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật và Công nghệ Việt Nam, tháng 04/2021.
https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/article/view/1060/981

3. **Truong Huynh Anh Vu, Nguyen Hoang Khue Tu**, Chu Van Hai, Huynh Yen Ha, Nguyen Anh Duc (2021). Characteristics of quinolone-resistance *Salmonella* producing beta-lactamase isolated from raw meat in Ho Chi Minh City. Vietnamese Journal of Food Control, tháng 06/2021.
http://vjfc.nifc.gov.vn/ajax/research/getfile?filecode=df8aaf91-3570-4157-b76a-e412f22373cf

4. **Trương Huỳnh Anh Vũ, Nguyễn Hoàng Khuê Tú**, Huỳnh Yên Hà, Chu Vân Hải. Khảo sát mức độ nhiễm và đặc điểm kháng kháng sinh của *Salmonella* spp. phân lập từ thực phẩm tại các chợ truyền thống trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh. Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học, đã có thư chấp nhận đăng bài.
https://drive.google.com/file/d/1nuSj1f_bp_0A-jsfdmvx56O8Q-TKd-9C/view?usp=sharing

5. **Trương Huỳnh Anh Vũ, Nguyễn Hoàng Khuê Tú,** Huỳnh Yên Hà, Chu Vân Hải, Bùi Nhật Tâm. Đặc điểm kháng kháng sinh nhóm quinolone của *Salmonella* spp. sinh beta-lactamase phân lập từ thủy hải sản tươi sống trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh. Hội Nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc 10/2021.
https://drive.google.com/file/d/1_OE4BnEeKBfDgKBbHwoV14DrTVMMHuXh/view?usp=sharing

6. **Truong Huynh Anh Vu, Nguyen Hoang Khue Tu**, Chu Van Hai, Huynh Yen Ha. Antibiotic resistance in *Salmonella* isolated from Ho Chi Minh city (Vietnam) and difference of sulfonamide resistance gene existence in serovars. Journal of Pure and Applied Microbiology.
https://drive.google.com/file/d/1e8wbe1eGUD9YZTZHE58daBx1XLd75k_R/view?usp=sharing

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng việt

1. Bộ YT (Bộ Y tế), 2008. An toàn thực phẩm. NXB Y học.
2. Bộ YT (Bộ Y tế), 2011. Thông tư 14/2011/TT-BYT về hướng dẫn chung về lấy mẫu thực phẩm phục vụ thanh tra, kiểm tra chất lượng, vệ sinh an toàn thực phẩm.
3. Chi cục Thú y TP. HCM, 2015. Báo cáo số 1108/BC-CCTY: Kết quả công tác ATTP nguồn gốc động vật giai đoạn 2011-2015 và đề xuất kế hoạch giai đoạn 2016-2020.
4. Chử Văn Tuất, Trần Thị Mai Thảo, Vũ Dũng Minh, Phạm Thị Trang, Khúc Thị San, Trần Thị Hà, Nguyễn Trường Linh, Đỗ Văn Tĩnh, và Nguyễn Thị Thu Hằng, 2016. Nghiên cứu tồn dư một số kháng sinh và beta-agonist trong thịt tươi (heo, gà) và nước tiểu heo tại lò mổ ở một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. Khoa học Kỹ thuật Thú y. 5(23).
5. Đỗ Ngọc Thúy, Cù Hữu Phú, Văn Thị Hường, Nguyễn Xuân Huyên, Nguyễn Bạch Huệ, 2006. Đánh giá tình hình nhiễm một số loại vi khuẩn gây bệnh trong thịt heo tươi trên địa bàn Hà Nội. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y. 3(8): 48-54.
6. Hoàng Hoài Phương, Nguyễn Thị Kê, Phạm Hùng Vân, Nguyễn Đỗ Phúc, Nguyễn Thị Anh Đào, 2008. Khảo sát gen kháng kháng sinh của một số vi khuẩn gây bệnh phân lập từ thực phẩm. Tạp chí Y Học TP. HCM. 12(4): 283-290.
7. Lã Văn Kính, 2007. Nghiên cứu sản xuất thịt heo an toàn chất lượng cao. Báo cáo đề tài cấp Nhà nước thuộc chương trình Nghiên cứu ứng dụng các giải pháp khoa học công nghệ để tổ chức sản xuất và quản lý nông sản thực phẩm an toàn và chất lượng cao.
8. Lê Hữu Nghị, Tăng Mạnh Nhật, 2005. Tình trạng ô nhiễm vi sinh vật trong thịt qua giết mổ và bày bán tại một số chợ TP. Huế. Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y. 2(7): 39-45.
9. Lê Văn Du, Hồ Thị Kim Hoa, 2017. Tình hình tồn dư chất tạo nạc, kháng sinh và nhiễm *Salmonella* trong thịt heo và gà tiêu thụ tại thành phố Hồ Chí Minh. Tạp chí KHKT Nông lâm Nghiệp. (5): 46-55.
10. Lê Văn Phủng, 2012. Vi khuẩn Y học. NXB giáo dục Việt Nam, Hà Nội.
11. Nguyễn Đắc Trung, 2012. Đặc điểm kháng kháng sinh và cơ chế truyền gen kháng thuốc ở các chủng *Salmonella typhi* phân lập tại Việt Nam. Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên. 89(1): 157-161.
12. Nguyễn Như Thanh, Nguyễn Bá Hiên, Trần Thị Lan Hương, 2001. Vi sinh vật Thú y. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
13. Nguyễn Thanh Long, 2015. Xác định sự hiện diện một số serotype và gen độc lực của vi khuẩn *Salmonella* phân lập từ thịt tươi trên địa bàn TP HCM. Luận văn Thạc sỹ Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam.

14. Nguyễn Thanh Việt, Nghiêm Ngọc Minh, Võ Thị Bích Thuỷ, 2018. Nghiên cứu đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *Salmonella* phân lập từ mẫu thịt heo, thịt bò và thịt gà tại các chợ bán lẻ tại Hà Nội. Tạp chí Công nghệ Sinh học. 16(3): 553-564.
15. Nguyễn Thị Hoài Thu, Nguyễn Thanh Việt, Nguyễn Thị Nhã Quyên, Nghiêm Ngọc Minh, 2017. Đánh giá sự biểu hiện một số gen kháng thuốc của chủng vi khuẩn *S.* Typhimurium phân lập từ thịt lợn tươi ở Hà Nội. Tạp chí Sinh học. 39(2): 210-218.
16. Phạm Hồng Ngân, Cam Thị Thu Hoài, Lưu Văn Ba, 2014. Xác định tỷ lệ nhiễm và tính kháng kháng sinh của vi khuẩn *Salmonella* spp. phân lập từ thịt heo ở một số chợ thuộc huyện Gia Lâm, thành phố Hà Nội. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y. 2(21): 63-67.
17. Quách Văn Cao Thi, Huỳnh Thị Diễm Trang và Từ Thanh Dung, 2015. Sự hiện diện của các integron nhóm 1 ở vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi thâm canh ở đồng bằng sông Cửu long. Tạp chí Khoa hoc Trường Đại học Cần Thơ. 40(1): 75-82.
18. TCVN 8342:2010, Thủy sản và sản phẩm thủy sản - Phát hiện *Salmonella* bằng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymeraza (PCR).
19. Trần Thị Thùy Giang, Nguyễn Thị Nguyệt, Nguyễn Văn Trí, Nguyễn Thị Lệ, Vương Xuân Vân, Uông Nguyễn Đức Ninh, Phẩm Minh Thu, Cao Hữu Nghĩa, 2014. Khảo sát độ nhiễm khuẩn và khả năng kháng kháng sinh của *E. coli* phân lập từ thực phẩm tại viện Pasteur. Tạp chí Khoa học, Đại học Sư phạm TP. HCM.
20. Võ Thị Trà An, Nguyễn Ngọc Tuân, Lê Hữu Ngọc, 2006. Tình hình nhiễm *Salmonella* trong phân và thân thịt (bò, heo, gà) tại một số tỉnh phía Nam. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y. 2(8): 37-42.

Tiếng Anh

21. Abatcha M. G., Thong K. L., 2014. Review Article: Atrends of *Salmonella* and antibiotic resistance. Advanced Sciences and Technologies. 17: 9-21.
22. Achtman M., Wain J., Weill F. X., Nair S., Sangal V., Krauland M. G., Hale J. L., Uesbeck A., Brisse S., 2012. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. PLoS Pathogens. 8(6): e1002776.
23. Adesiji Y. O., Deekshit V. K., Karunasagar I., 2014. Antimicrobial resistant genesassociated with *Salmonella* spp. isolated from human, poultry, and seafood sources. Food Science and Nutrition. 2: 436-442.
24. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff., Roberts M., Artmed P., 2004. Regulation of gene expression. Biologia Molecular da Célula Porto Alegre. 375-466.
25. Alcaine S. D., Sukhnanand S. S., McGann P., McDonough P., Wiedmann M., 2005.

Ceftiofur resistant *Salmonella* strains isolated from dairy farms represent multiple widely distributed subtypes that evolved by independent horizontal gene transfer. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49(10): 4061-4067.

26. Andres P., Lucero C., Albornoz E., Tran T., Zorreguieta A., Galas M., Corso A., Tolmasky M. E., Petroni A., 2013. Differential distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical enterobacteria with unusual phenotypes of quinolone susceptibility from Argentina. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 57(6): 2467-2475.
27. Antunes P., Machado J., Peixe L., 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 58(2): 297-304.
28. Arakawa Y., Murakami M., Suzuki K., Ito H., Ohsuka S., Kato N. and Ohta M., 1995. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39: 1612-1615.
29. Asgharpour F., Mahmoud S., Marashi A. and Moulana Z., 2018. Molecular detection of class 1, 2 and 3 integrons and some antimicrobial resistance genes in *Salmonella* Infantis isolates. Iranian Journal of Microbiology. 10(2): 104-110.
30. Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Turck M., 1996. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 45(4): 493-496.
31. Biffi C., Stefani L., Miletti L., Matiello C., Neves G., 2014. Phenotypic and genotypic resistance profile of *Salmonella typhimurium* to antimicrobials commonly used in poultry. Revista Brasileira de Ciencia Avicola. 16: 93-96.
32. Bush K., Jacoby G. A., 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 54(3): 969-976.
33. Cai Y., Tao J., Jiao Y., Fei X., Zhou L., Wang Y., Zheng H., Pan Z., Jiao X., 2016. Phenotypic characteristics and genotypic correlation between *Salmonella* isolates from a slaughterhouse and retail markets in Yangzhou, China. International Journal of Food Microbiology. 222: 56-64.
34. Cameron F. H., Obbink D. J. G., Ackerman V. P. and Hal R. M., 1986. Nucleotide sequence of the AAD2 aminoglycoside adenylyltransferase determinant *aad*B. Evolutionary relationship of this region with those surrounding aadA in R538-1 and dhfrll in R388. Nucleic Acids Research. 14(21): 8625-8635.
35. Cao V., Lambert T., Nhu D. Q., 2002. Distribution of extended spectrum β-Lactamases

in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. Antimicrobial agents and Chemotherapy. 46(12): 3739-3743.

36. Carrique-Mas J. J., 2015. Sources of antibiotic resistant bacteria in humans and drivers leading to resistant bacteria. Management and use of antimicrobials and antibiotics in the livestock sector, 30 October 2015, Da Nang, Viet Nam.
37. Cao G., Allard M., Hoffmann M., Muruvanda T., Luo Y., Zhao S., McDermott P., Brown E., Meng J., 2018. Sequence analysis of *Inc*A/C and *Inc*I1 plasmids isolated from multidrug-resistant *Salmonella* Newport using single-molecule real-time sequencing. Foodborne Pathogens and Disease. 15(6): 361-371.
38. Carattoli A., Bertini A., Villa L., Falbo V., Hopkins K. L., Threlfall E. J., 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. Journal of Microbiological Methods. 63(3): 219-228.
39. Cambray G., Guerout A.M., and Mazel D., 2010. Integrons. Annual Review of Genetics. 44: 141-166.
40. Chaconas G., Craig N., Curcio M. J., Levin H., Rice P. A., and Voytas D. F., 2010. Meeting report for mobile DNA 2010. Mobile DNA. 1(1): 20.
41. Chang C., Chang L., Chang Y., 2000. Characterisation of drug resistance gene cassettes associated with class 1 integrons clinical isolates of *Escherichia coli* from Taiwan. Journal of Medical Microbiology. 49(12): 1097-1102.
42. Chau T. T., Campbell J. I., Galindo C. M., Van Minh Hoang N., Diep T. S., Nga T. T., Van Vinh Chau N., Tuan P. Q., Page A. L., Ochiai R. L., Phuong L. T., Van Be Bay P., Seidlein L., Vinh H., Hien T. T., Chinh N. T., Acosta C. J., Farrar J., Dolecek C., 2007. Antimicrobial drug resistance of *Salmonella* enterica serovar typhi in asia and molecular mechanism of reduced susceptibility to the fluoroquinolones. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 51(12): 4315-4323.
43. Chen S., Zhao S., White D. G., Schroeder C. M., Lu R., Yang H., McDermott P. F., Ayers S., and Meng J., 2004. Characterization of multiple antimicrobial resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. Applied and Environmental Microbiology. 70(1): 1-7.
44. Chenia H. Y. and Vietze C., 2012. Tetracycline resistance determinants of heterotrophic bacteria isolated from a South African tilapia aquaculture system. African Journal of Microbiology Research. 6: 6761-6768.
45. Cheung T. K., Chu Y. W., Chu M. Y., Ma C. H., Yung R. W., Kam K. M., 2005. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of

Salmonella enterica serotype Enteritidis in Hong Kong. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 56(3): 586-589.

46. Choi D., Chon J. W., Kim H. S., Kim D. H., Lim J. S., Yim J. H., Seo K. H., 2015. Incidence, antimicrobial resistance, and molecular characteristics of nontyphoidal *Salmonella* including extended-spectrum betalactamase producers in retail chicken meat. Journal of Food Protection. 78(11): 1932-1937.
47. Chopra I. and Roberts M., 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65: 232-260.
48. CLSI, 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
49. Collis C. M., Briton J., Stokes H.W. and Hall R.M., 1993. Site specific insertion of gen cassettes into integrons. Molecular Microbiology. 9: 41-52.
50. Collis C. M. and Hall R. M., 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39: 155-162.
51. Correia M., Boavida F., Grosso F., Lito L. M., Cristino J. M., Mendo S., Duarte A., 2003. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47: 2838-2843.
52. Couturier M., Bex F., Bergquist P. L., and Maas W. K., 1988. Identification and classification of bacterial plasmids. Microbiol Reviews. 52(3): 375-395.
53. Crump J. A., Medalla F. M., Joyce K. W., Hoekstra R. M., Whichard J. M., Barzilay E. J., 2011. Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella* enterica isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 55(3): 1148-1154.
54. Dang H., Zhang X., Song L., Chang Y. and Yang G., 2007. Molecular determination of oxytetracycline resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China. Journal of Applied Microbiology. 103: 2580-2592.
55. Davies J., and Davies D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 74: 417-433.
56. Dawes F., Kuzevski A., Bettelheim K., 2010. Distribution of class 1 integrons with is mediated deletions in their 3′-conserved segments in *Escherichia coli* of human and animal origin. PLoS ONE. 5(9): e12754.
57. Divek V. T. N., Kumar V. and Anup K. J., 2018. Antibiotic resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. Foods. 7(167): 1-

24.

58. Doosti A., Mahmoudi E., Jami M. S., Farsani A. M., 2016. Prevalence of *aad*A1, *aad*A2, *aad*B, *str*A and *str*B genes and their associations with multidrug resistance phenotype in *Salmonella* Typhimurium isolated from poultry carcasses. The Thai Journal of Veterinary Medicine. 46(4): 691-697.
59. Eaves D. J., Liebana E., and Piddock L. J. V., 2002. Detection of gyrA mutations in quinolone resistant *Salmonella enterica* by denaturing high performance liquid chromatography. Journal of Clinical Microbiology. 40(11): 4121-4125.
60. Eaves D. J., Randall L., Gray D. T., Buckley A., Woodward M. J., White A. P. and Piddock L. J. V., 2004. Prevalence of mutations within the quinolone resistance determining region of *gyr*A, *gyr*B, *par*C, and *par*E and association with antibiotic resistance in quinolone resistant *Salmonella enterica*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48(10): 4012-4015.
61. ECDC. *Salmonella* the Most Common Cause of Foodborne Outbreaks in the European Union. 2020. Available online: https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/salmonella-most-common-cause-foodborne-outbreaks-european-union (accessed on 2 March 2020).
62. Elder J. R., Chiok K. L., Paul N. C., Haldorson G., Shah D. H., 2016. The *Salmonella* pathogenicity island 13 contributes to pathogenesis in streptomycin pretreated mice but not in day-old chickens. Gut Pathogens. 8: 1-16.
63. Endimiani A. C. L., Hujer A. M., 2008. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing BLA_{KPC} in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 52(7): 2680-2682.
64. Fluit A. C. and Schmitz F. J., 1999. Class 1 integrons, gen cassettes, mobility, and epidemiology. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 18: 761-770.
65. Fluit A. C. and Schmitz F. J., 2004. Resistance integrons and super integrons. Clinical Microbiology and Infection. 10: 272-288.
66. Folster J. P., Campbell D., Grass J., Brown A. C., Bicknese A., Tolar B., Joseph L. A., Walker C., Whichard J. M., 2015. Identification and characterization of multidrug-resistant *Salmonella* enterica serotype Albert isolates in the United States. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 59(5): 2774-2779.
67. Folster J. P., Grass J. E., Bicknese A., Taylor J., Friedman C. R., Whichard J. M., 2017. Characterization of resistance genes and plasmids from outbreaks and illness clusters caused by *Salmonella* resistant to ceftriaxone in the United States, 2011-2012. Microbial

Drug Resistance. 23(2):188-193.

68. Frost L. S., Leplae R., Toussaint A., 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. Nature Reviews Microbiology. 3: 722-732.
69. Garcia-Migura L., Sunde M., Karlsmose S., Veldman K., Schroeter A., Guerra B., Clemente L., Boerlin P., Moreno M. A., Daignault D., Aarestrup F. M., 2012. Establishing streptomycin epidemiological cut-off values for *Salmonella* and *Escherichia coli*. Microbial Drug Resistance. 18(1): 88-93.
70. Ghazaei C., 2018. Phenotypic and molecular detection of β-lactamase genes *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{CTX}$, and *bla*$_{SHV}$ produced by *Salmonella* spp. isolated from poultry meat. Gene Cell Tissue. 5(4): e84367.
71. Goldstein C., Lee M. D., Sanchez S., Hudson C., Phillips B., Register B., Grady M., Liebert C., White D.G. and Maurer J. J., 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45: 723-726.
72. Gopal M., Elumalai S., Arumugam S., Durairajpandian V., Kannan M. A., Selvam E., Seetharaman S., 2016. *Gyr*A ser83 and *Par*C trp106 mutations in *Salmonella* enterica serovar typhi isolated from typhoid fever patients in tertiary care hospital. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 10(7): 14-18.
73. Guerin E., Cambray G., Sanchez-Alberola N., Campoy S., Erill I., Da Re S., Gonzalez-Zorn B., Barbé J., Ploy M. C., Mazel D., 2009. The SOS response controls integron recombination. Science. 324(5930): 1034.
74. Güerri M. L., Aladueña A., Echeita A., Rotger R., 2004. Detection of integrons and antibiotic-resistance genes in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium isolates with resistance to ampicillin and variable susceptibility to amoxicillin-clavulanate. International Journal of Antimicrobial Agents. 24: 327-333.
75. Guillaume G., Verbrugge D., Libotte M. L. C., Moens W., Collard J. M., 2000. PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A–E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. FEMS Microbiology Ecology. 32(1): 77-85.
76. Gunn J. S., Lim K. B., Krueger J., Hackett M. , Miller S. I., 1998. PmrAPmrB regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. Molecular Microbiology. 27: 1171-1182.
77. Hansson K., Sundstrom L., Pelletier A. and Roy P. H., 2002. *IntI*2 integron integrase in Tn*7*. The Journal of Bacteriology. 184: 1712-1721.

78. Helms M., Ethelberg S., Molbak K., 2005. International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. Emerging Infectious Diseases. 11(6): 859-867.
79. Hochhut B., Lotfi Y., Mazel D., Woodgate R., and Waldor M. K., 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45: 2991-3000.
80. Hooper D. C., 1999. Mechanisms of fluroquinolone resistance. Drug Resistance Update. 2: 38-55.
81. Irani M. D., Faghani M., Doosti A., 2018. Study of class 1 to 3 integrons in *Salmonella* and antimicrobial resistance pattern isolated from broiler chicks. Electronic Journal of Biology. 14(2): 81-86.
82. ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella-Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
83. ISO/TR 6579-3:2014 Microbiology of the food chain-Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella-Part 3: Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp.
84. Jacoby G. A., 2009. Amp C beta-lactamases. Clinical Microbiology Reviews. 22(1): 161-182.
85. Jacobsen A., Hendriksen R. S., Aaresturp F. M., Ussery D. W., Friis C., 2011. The *Salmonella enterica* pan genome. Microbial Ecology. 62(3): 487- 504.
86. Jacquier H., Zaoui C., Sanson-le Pors M. J., Mazel D., Bercot B., 2009. Tranlation regulation of integrons gene cassette expression by the attC sites. Molecular Microbiology. 72(6):1475-86.
87. Jones L., McIver C., Rawlinson W., 2003. Polymerase chain reaction screening for integrons can be used to complement resistance surveillance programs. Communicable Diseases Intelligence. 27: S103-S110.
88. Kang H. Y., Jeong Y. S., Oh J. Y., Tae S. H., Choi C. H., Moon D. C., Lee W. K., Lee Y. C., Cho D. T., and Lee J. C., 2005. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *E. coli* isolates from humans and animals in Korea. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 55: 639-644.
89. Katoh R., Matsushita S., Shimojima Y., Ishitsuka R., Sadamasu K., Kai A., 2015. Serovars and drug resistance of *Salmonella* strains isolated from domestic chicken meat in Tokyo (1992-2012). Kansenshogaku Zasshi. 89(1): 46-52.
90. Kaushik M., Kumar S., Kapoor R. K., Gulati P., 2019. Integrons and antibiotic resistance genes in water-borne pathogens: threat detection and risk assessment. Journal of Medical

Microbiology. 68(5).
91. Khan A. U., Zarrilli R., 2012. Multidrug Resistance: A Global Concern. Bentham Science. India.
92. Kim S., Kim S. H., Kim J., Shin J. H., Lee B. K. and Park M.S., 2010. Occurrence and distribution of various genetic structures of class 1 and class 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from foodborne disease patients in Korea for 16 years. Foodborne Pathogens and Disease. 8: 319-324.
93. Kiratisin P., Apisarnthanarak A., Saifon P., Laesripa C., Mundy L. M., 2007. The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum β-lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 58: 349-355.
94. Klemm E. J., Shakoor S., Page A. J., Qamar F. N., Judge K., Saeed D. K., Wong V. K., Dallman T. J, Nair S., Baker S., Qureshi S., Yousafzai M. T., Saleem M. K., Hasan Z., Dougan G., Hasan R., 2018. Emergence of an extensively drug-resistant *Salmonella* enterica serovar typhi clone harboring a promiscuous plasmid encoding resistance to fluoroquinolones and third generation cephalosporins. *mBio*. 9(1): e00105-18.
95. Koczura R., Semkowska A. and Mokracka J., 2014. Integron bearing gram negative bacteria in lake waters. Letters in Applied Microbiology. 59: 514-519.
96. Kudirkiene E., Andoh L. A., Ahmed S., Fresno A. H., Dalsgaard A., Danso K. O. and Olsen J. E., 2018. The use of a combined bioinformatics approach to locate antibiotic resistance genes on plasmids from whole genome sequences of *Salmonella enterica* serovars from humans in Ghana. Frontiers in Microbiology.
97. Labbate M., Case R. J. and Stokes H. W., 2009. The integron/gen cassette system: an active player in bacterial adaptation. Methods in Molecular Biology. 532: 103-125.
98. Lai J., Wu C., Qi J., Wang Y., Shen J., 2014. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. International Journal of Food Microbiology. 180: 30-38.
99. Leplae R., Hebrant A., Wodak S. J. and Toussaint A., 2004. A classification of mobile genetic elements. Nucleic acids Research. 32: D45-D49.
100. Levy S. B., McMurry L. M., Barbosa T. M., Burdett V., Courvalin P., Hillen W., Rood J. I., Taylor D. E., 1999. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43(6): 1523-1524.
101. Levy S. B., McMurry L. M., Roberts M. C., 2005. Tet protein hybrids. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49(7): 3099.

102. Li Y. C., Pan Z. M., Kang X. L., Geng S. Z., Liu Z. Y., Cai Y. Q., Jiao X. A., 2014. Prevalence, characteristics, and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* in retail pork in Jiangsu province, eastern China. Journal of Food Protection. 77(2): 236-245.
103. Liu B., Pop M., 2009. ARDB-Antibiotic resistance genes database. Nucleic Acids Research. 37: 443-447.
104. Machado E., Coque T. M., Canton R., Baquero F., Sousa J. C., Peixe L., 2006. Dissemination in Portugal of CTX-M-15, OXA-1, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes aminoglycoside and fluoroquinolone-modifying enzyme. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 50: 3220-3221.
105. Madsen L., Aarestrup F. M., Olsen J. E., 2000. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella* Typhimurium. Veterinary Microbiology. 75(1): 73-82.
106. Mascaretti O. A., 2003. Bacteria versus antibacterial agents. mBio. United States.
107. Martinez-Martinez L., Pascual A., Garcia I., Tran J., Jacoby G. A., 2003. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 51: 1037-1039.
108. Martiny A. C., Martiny J. B. H., Weihe C., Field A., Ellis J. C., 2011. Functional metagenomics reveals previously unrecognized diversity of antibiotic resistance genes in gulls. Frontiers in Microbiology. 2(238): 1-11.
109. McDermott P. F., Tyson G. H., Kabera C., Folster J. P., Ayers S. L., Lam C., Tate H. P., Zhao S., 2016. Whole genome sequencing for detecting antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 60(9): 5515-5520.
110. Mihaiu L., Lapusan A., Tanasuica R., Sobolu R., Mihaiu R., Oniga O., Mihaiu M., 2014. First study of *Salmonella* in meat in Romania. Journal of Infection in Developing Countries. 8(1):50-58.
111. Moe A. Z., Paulsen P., Pichpol D., Fries R., Irsigler H., Baumann M. P. O., 2017. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from chicken carcasses in retail markets in Yangon, Myanmar. Journal of Food Protection. 80(6): 947-951.
112. Mollenkopf D. F., Mathys D. A., Dargatz D. A., Habing G. G., Daniels J. B., Wittum T. E., 2017. Genotypic and epidemiologic characterization of extended-spectrum cephalosporin resistant *Salmonella enterica* from US beef feedlots. Preventive Veterinary Medicine. 146(1): 143-149.
113. Monthon L., Suparat S., Kumchai T., 2013. Antimicrobial resistance in *Salmonella*

enterica isolated from pork, chicken, and vegetables in southern Thailand. Jundishapur Journal of Microbiology. 6(1): 36-41.

114. Moura A., Henriques I., Correia A., 2007. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 60(6): 1243-1250.
115. Nguyen D. T., Kanki M., Nguyen P. D., Le H. T., Ngo P. T., Tran D. N., Le N. H., Dang C. V., Kawai T., Kawahara R., Yonogi S., Hirai Y., Jinnai M., Yamasaki S., Kumeda Y., Yamamoto Y., 2016. Prevalence, antibiotic resistance, and extended-spectrum and AmpC β-lactamase productivity of *Salmonella* isolates from raw meat and seafood samples in Ho Chi Minh City, Vietnam. International Journal of Food Microbiology. 7(236):115-122.
116. Nguyen K. V., Thi D. N. T., Chandna A., Nguyen T. V., Pham C. V., Doan P. M., Nguyen A. Q., Thi N. C. K., Larsson M., Escalante S., Olowokure B., Laxminarayan R., Gelband H., Horby P., Thi N. H. B., Hoang M. T., Farrar J., Hien T. T., and Wertheim H. F., 2013. Antibiotic use and resistance in emerging economies: a situation analysis for Viet Nam. BMC Public Health. 13: 1158.
117. Nikaido H., 2009. Multidrug resistance in bacteria. Annual Review of Biochemistry. 78: 119-146.
118. O'Neill J., 2016. The review on antimicrobial resistance. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.
119. Park A. K., Shin E., Kim S., Park J., Jeong H. J., Chun J. H., Hwang K. J., Kim J., 2019. Traveller associated high level ciprofloxacin resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky in the Republic of Korea. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 22 (2020): 190-194.
120. Partridge S. R., Coiera E. and Iredell J. R., 2009. Gen cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiological Reviews. 33: 757-84.
121. Patchanee P., Tansiricharoenkul K., Buawiratlert T., Wiratsudakul A., Yamsakul P., Yano T., Boonkhot P., Rojanasatien S., Tadee P., 2016. *Salmonella* in pork retail outlets and dissemination of its pulsotypes through pig production chain in Chiang Mai and surrounding areas, Thailand. Preventive Veterinary Medicine. 130: 99-105.
122. Phan T. T., Khai L. T., Ogasawara N., Tam N. T., Okatani A. T., Akiba M., Hayashidani H., 2005. Contamination of *Salmonella* in retail meats and shrimps in the Mekong Delta, Vietnam. Journal of Food Protection. 68(5): 1077-1080.
123. Poirel L., Gniadkowski M., Nordmann P., 2002. Biochemical analysis of the

ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β-lactamase CTX-M-3. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 50: 1031-1034.

124. Quinn P. J., Carter M. E., Makey B. K., Carter G. R., 2002. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Pulishing, London WC1 H9LB.
125. Quoc P. L., Shuhei U., Thi N. H. N., Thi V. K. D., Thi A. V. H., Thi T. N. T., Itaru H., Tatsuya N., Ryuji K., Thai H. D., Quang M. V., and Yoshimasa Y., 2015. Characteristics of extended-spectrum β-Lactamase producing *Escherichia coli* in retail meats and shrimp at a local market in Vietnam. Foodborne Pathogens and Disease. 12(8): 719-725.
126. Recchia G. D. and Hall R. M., 1995. Gen cassettes: A new class of mobile element. Microbiology. 141: 3015-3027.
127. Rijavec M., Erjavec M., Avgustin J. , 2006. High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *E. coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. Current Microbiology. 53(2): 158-162.
128. Roberts M. C., 2005. Update on aquired tetracycline resistance gene. FEMS Microbiology Letters. 245: 195-203.
129. Rodríguez I., Rodicio M.R., Mendoza M. C. and Martın M.C., 2006. Large conjugative plasmids from clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Virchow contain a class 2 integron in addition to class 1 integrons and several non integron associated drug resistance determinants. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 50: 1603-1607.
130. Roland K. L., Martin L. E., Esther C. R., Spitznagel J. K., 1993. Spontaneous pmrA mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new two component regulatory system with a possible role in virulence. Journal of Bacteriology. 175: 4154-4164.
131. Rowe-Magnus D. A. and Mazel D., 2002. Resistance gene capture. Current Opinion in Microbiology. 2: 483-488.
132. Saenz Y. L., Brinas E., Dominguez J., Ruiz M., Zarazaga J. V. and Torres C., 2004. Mechanisms of resistance in multiple antibiotic resistant *E. coli* strains of human, Animal, and food origins. Antimicrobial Agents and Chemmotherapy. 48: 3996-4001.
133. Schoder D., Strauß A., Szakmary-Brändle K., Stessl B., Schlager S., Wagner M., 2014. Prevalence of major foodborne pathogens in food confiscated from air passenger luggage. International Journal of Food Microbiology. 401-402.
134. Sjölund-Karlsson M., Howie R., Krueger A., Rickert R., Pecic G., Lupoli K., 2011. CTX-M-producing non-Typhi *Salmonella* spp. isolated from humans, United States. Emerging Infectious Diseases. 17: 97-99.

135. Song Q., Xu Z., Gao H., Zhang D., 2018. Overview of the development of quinolone resistance in *Salmonella* species in China, 2005-2016. Infection and Drug Resistance. 11: 267-274.
136. Stokes H. W. and Hall R.M., 1989. A novel family of potentially mobile AND elements encoding site specific gene integration functions: integrons. Molecular Microbiology. 3: 1669-1683.
137. Ta Y. T., Nguyen T. T., To P. B., Pham D. X., Le H. T., Thi G. N., Alali W. Q., Walls I., Doyle M. P., 2014. Quantification, serovars, and antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from retail raw chicken meat in Vietnam. Journal of Food Protection. 77: 57-66.
138. Tadee P., Boonkhot P., Patchanee P., 2014. Quantification of contamination levels and particular risk of *Salmonella* spp. in pigs in slaughterhouses in Chiang Mai and Lamphun provinces, Thailand. Japanese Journal of Veterinary Research. 62(4): 171-179.
139. Thai T. H., Hirai T., Lan N. T., Yamaguchi R., 2012. Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serovars isolated from retail pork and chicken meat in North Vietnam. International Journal of Food Microbiology. 156(2): 147-151.
140. Thai T. H., Yamaguchi R., 2012. Molecular characterization of antibiotic-resistant *Salmonella* isolates from retail meat from markets in Northern Vietnam. Journal of Food Protection. 75: 1709-1714.
141. Thomson N., Baker S., Pickard D., Fookes M., Anjum M., Hamlin N., Wain J., House D., Bhutta Z., Chan K., Falkow S., Parkhill J., Woodward M., Ivens A. A., Dougan G., 2004. The role of prophage like elements in the diversity of *Salmonella* enterica serovars. Journal of Molecular Biology. 339(2): 279-300.
142. Thong K. L., Modarressi S., 2011. Antimicrobial resistant genes associated with *Salmonella* from retail meats and street foods. Food Research International. 44: 2641-2646.
143. Tirziu E., Lazar R., Sala C., Nichita I., Morar A., Seres M., Imre K., 2015. *Salmonella* in raw chicken meat from the Romanian seaside: frequency of isolation and antibiotic resistance. Journal of Food Protection. 78(5): 1003-1006.
144. Van T. T. H., Moutafis G., Tran L. T., Coloe P. J., 2007a. Antibiotic resistance in food-borne bacterial contaminants in Vietnam. Applied and Environmental Microbiology. 73: 7906-7911.
145. Van Essen-Zandbergen A., Smith H., Veldman K. and Mevius D., 2007b. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *E. coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 59: 746-750.

146. Wannaprasat W., Padungtod P., Chuanchuen R., 2011. Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans. International Journal of Antimicrobial Agents. 37: 457-461.
147. Wassenaar T. M., Jun S. R., Wanchai V., Patumcharoenpol P., Nookaew I., Schlum K., Leuze M. R. and Ussery D. W., 2017. Insights from comparative genomics of the genus *Salmonella*. DOI: 10.5772/67131.
148. White P. A., McIver C. J., and Rawlinson W. D., 2001. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45: 2658-2661.
149. WHO (World Health Organization), 2016, 2017. Critically important antimicrobials for human medicine.
150. Wold B., Myers R. M., 2008. Sequence census methods for functional genomics. Nature Methods. 5(1): 19-21.
151. Wong V. K., Baker S., Parkhill J., 2015. Phylogeographical analysis of the dominant multidrug-resistant H58 clade of *Salmonella* Typhi identifies inter and intracontinental transmission events. Nature Genetics. 47(6): 632-639.
152. Yang B., Qu D., Zhang X., Xi M., Sheng M., Zhi S., Meng J., 2010. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. International Journal of Food Microbiology. 141: 63-72.
153. Yang H., Byelashov O. A., Geornaras I., Goodridge L. D., Nightingale K. K., Belk K. E., Smith G. C., and Sofos J. N., 2010. Characterization and transferability of class 1 integrons in commensal bacteria isolated from farm and nonfarm environments. Foodborne Pathogens and Disease. 7: 1441-1451.
154. Zankari E., Hasman H., Kaas R. S., Seyfarth A. M., Agerso Y., Lund O., Larsen M. V., Aarestrup F. M., 2013. Genotyping using whole genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 68(4): 771-777.
155. Zou W., Frye J. G., Chang C. W., Liu J., Nayak R., 2009. Microarray analysis of antimicrobial resistance genes in *Salmonella* enterica from preharvest poultry environment. Journal of Applied Microbiology. 107(3): 906-914.
156. Xu Z., Li L., Shi L., Shirtliff M. E., 2011. Class 1 integron in *Staphylococci*. Molecular Biology Reports. 38(8): 5261-5279.

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC A: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

A1. Các dạng sản phẩm đại diện cho từng nhóm thực phẩm

Nhóm	Trứng	Thịt	Thủy hải sản	Rau, củ, quả
Sản phẩm	- Trứng gà, vịt, cút tươi - Sản phẩm từ trứng (trứng muối, trứng bắc thảo,…)	- Thịt heo, bò, gà tươi - Thịt và sản phẩm thịt (nem chua, chà bông, lạp xưởng, chả chiên, chả lụa,…)	- Thủy hải sản tươi (cá, mực, tôm,…) - Sản phẩm chế biến từ thủy hải sản (cá hấp, tôm khô, mắm,…)	- Rau củ quả tươi - Rau quả muối, rau quả khô

A2. Môi trường, hóa chất, thuốc thử dùng phân lập *Salmonella* spp.

STT	Môi trường nuôi cấy, hóa chất, thuốc thử		Hãng/Code
1	Môi trường tăng sinh không chọn lọc	Buffer Pepton Water (BPW)	Merck/1.07228
2	Môi trường tăng sinh chọn lọc	Rappaport-Vassiliadis medium with soya (RVS Broth)	Merck/1.07700
3		Muller-Kauffmann tetrathionate-novoniocin (MKTTn Broth)	Merck/1.05878
4	Môi trường thạch chọn lọc	Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV agar)	Merck/1.09878
5		Xylose Lysine Deoxychonate agar (XLD agar)	Merck/1.05287
6		MLCB agar	Oxoid/CM0783
7	Thạch dinh dưỡng	Nutrient agar (NA)	Merck/1.05450
8	Môi trường sinh hóa	Triple sugar/iron agar (TSI agar)	Merck/1.03915
9		Ure agar	Merck/1.08492
10		Lysine decarboxylation medium (LDC)	Oxoid/CM0308
11		ONPG	Oxoid/DD13
12		Tryptone/tryptophan medium	Scharlau/02-418
13		Thuốc thử Kovacs	Merck/1.09293
14	Kháng huyết thanh	Kháng huyết thanh O	Difco/222641
15		Kháng huyết thanh H	Difco/224061
16		Kháng huyết thanh Vi	Difco/228271
17	Kit thử sinh hóa	API 20E	Biomérieux/20100

A3. Thành phần môi trường BHI và Mueller Hinton

Tên môi trường	Thành phần	Hàm lượng (g/l)	Ghi chú
Canh thang BHI	Sản phẩm thủy phân từ mô tế bào động vật bằng enzym	10,0	pH 7,4±0,2 ở 25°C
	Bột não bê	12,5	
	Bột tim bò	5,0	
	Glucose	2,0	
	Natri clorua	5,0	
	Dinatri hydrophosphat, khan (Na_2HPO_4)	2,5	
Mueller-Hinton	Dịch thủy phân mô động vật bằng enzym	300,0	pH 7,3±0,1 ở 25°C
	Dịch thủy phân casein bằng enzym	17,5	
	Tinh bột, có thể hòa tan	1,5	
	Thạch	17,0	

A4. Môi trường thử nghiệm sinh hóa

* Thạch TSI (*Triple Sugar Iron Agar*)

Cấy ria trên bề mặt nghiêng của thạch và cấy đâm sâu xuống đáy. Ủ ở 37°C trong (24±3) giờ. Diễn giải các thay đổi trong môi trường như sau:

a) Cấy đâm sâu

- màu vàng — glucose dương tính (lên men glucose)
- màu đỏ hoặc không đổi màu — glucose âm tính (không lên men glucose)
- màu đen — sinh hydro sulfid
- bọt khí hoặc nứt thạch — sinh khí từ glucose

b) Bề mặt nghiêng của thạch

- màu vàng — lactose và/hoặc sucrose dương tính (lên men lactose và/hoặc sucrose)
- màu đỏ hoặc không đổi màu — lactose và sucrose âm tính (không lên men lactose hoặc sucrose)

Phần lớn các chủng cấy *Salmonella* điển hình thể hiện tính kiềm (màu đỏ) trên bề mặt nghiêng của thạch và tính axit (màu vàng) có sinh khí (bọt khí), (với khoảng 90% trường hợp) sinh hydro sunfua (thạch bị đen) khi cấy đâm sâu.

* Thạch urê

Cấy ria trên bề mặt nghiêng của thạch. Ủ ở 37°C/24 giờ. Nếu phản ứng dương tính thì urê được phân giải thành amoniac, làm phenol đỏ chuyển thành màu hồng và sau đó chuyển thành màu đỏ anh đào sẫm. Phản ứng thường xuất hiện sau 2 đến 4 giờ. Các chủng cấy *Salmonella* điển hình không phân giải urê, do đó thạch urê sẽ không đổi màu.

* Môi trường LDC (L-Lysin Decarboxylase)

Cấy ngay phía dưới bề mặt của môi trường lỏng. Ủ ở 37°C trong (24±3) giờ. Môi trường đục và có màu đỏ tía sau khi ủ cho thấy phản ứng dương tính. Màu vàng cho thấy phản ứng âm tính. Phần lớn các chủng cấy *Salmonella* điển hình có phản ứng LDC dương tính.

A5. Diễn giải các phép thử sinh hóa của *Salmonella* spp.

Phép thử	Chủng *Salmonella*				
	S. typhi	***S. paratyphi* A**	***S. paratyphi* B**	***S. paratyphi* C**	**Khác**
Sinh axit từ glucose	+	+	+	+	+
Sinh khí từ glucose	-	+	+	+	+
Sinh axit từ lactose	-	-	-	-	-
Sinh axit từ sucrose	-	-	-	-	-
Sinh H_2S	+	-	+	+	+
Thủy phân ure	-	-	-	-	-
Lyzin đã khử nhóm cacboxyl	+	-	+	+	+
β-galactosidase	-	-	-	-	-
Sinh indol	-	-	-	-	-

A6. Diễn giải các kết quả các phép thử khẳng định

Phản ứng sinh hóa	Tự ngưng kết	Phản ứng huyết thanh	Diễn giải
Điển hình	Không	Kháng nguyên O và H dương tính (và Vi dương tính nếu thử nghiệm)	Các chủng được coi là *Salmonella*
Điển hình	Không	Kháng nguyên O và/hoặc H âm tính	Có thể là *Salmonella*
Điển hình	Có	Không thử nghiệm vì tự ngưng kết (xem 9.5.4.2)	
Không điển hình	-	-	Không được coi là *Salmonella*

A7. Quy trình xác định typ huyết thanh chủng phân lập *Salmonella* spp. bằng cách ngưng kết với các kháng huyết thanh OMA và OMB đa giá

Bước 1 Phân tích kháng nguyên-O	Sử dụng các kháng huyết thanh đa giá	1.1 OMA Nếu dương tính: bước 2.1.1 Nếu âm tính: sang bước 1.2	1.2 OMB Nếu dương tính: bước 2.2.1 Nếu âm tính: xem chú thích a
Bước 2 Phân tích kháng nguyên-O	Sử dụng các nhóm kháng huyết thanh đặc hiệu-dùng cho một chủng phân lập đối với nhóm huyết thanh[b]	2.1.1 O:4,5 hoặc nhóm B Nếu dương tính: bước 3.1.1 Nếu âm tính: bước 2.1.2 2.1.2 O:9 hoặc nhóm D Nếu dương tính: bước 3.1.2 Nếu âm tính: bước 2.1.3 2.1.3 O:3,10,15 hoặc nhóm E Nếu dương tính: bước 3.1.3 Nếu âm tính: bước 2.1.4 2.1.4 O:21 hoặc nhóm L Nếu âm tính: bước 2.1.5 2.1.5 O:1,2 hoặc nhóm A	2.2.1 O:6,7,8 hoặc nhóm C Nếu dương tính: bước 3.2.1 Nếu âm tính: bước 2.2.2 2.2.2 O:13.22,23 hoặc O:13 Nếu dương tính: bước 3.2.2 Nếu âm tính: bước 2.2.3 2.2.3 O:11
Bước 3 Phân tích kháng nguyên-O	Sử dụng các kháng huyết thanh đơn giá - nhận biết serovar kháng nguyên-O đặc hiệu	3.1.1 Chủng phân lập nhóm B: O:5, O:27 3.1.2 Chủng phân lập nhóm D: O:46 đối với nhóm D_2 O:27 đối với nhóm D_3 3.1.3 Chủng phân lập nhóm E: O:10, O:15, O:34 đối với nhóm E_1 O:19 đối với nhóm E_4	3.2.1 Chủng phân lập nhóm C O:7 đối với nhóm C_1 O:8, O:6_1, O:20 đối với nhóm C_{2-3} O:14, O:24, O:25 đối với nhóm H 3.2.2 Chủng phân lập nhóm G O:22, O:23
Bước 4 Phân tích kháng nguyên lông	Sử dụng các kháng huyết thanh đa giá	H đa giá (pha 1 và pha 2) H đa giá (pha 2)	
	Sử dụng các kháng huyết thanh đơn giá	H:1(1,2) → (H:2, H:5, H:6, H:7)[d] H:a, H:b, H:c, H:d, H:E→(H:h, H:n, H:x, Hz_{15})[d] H:G(g.m) → (H:f, H:g, H:m; H:p, H:q H:s, H:t, H:u][d] H:i, H:k. H:L→(H:v, H:w, H:l,z_{13}, H:l,z_{28})[d] H:y H:z, H:Z_4→ (H:z_{23}, H:z_{24}, H:z_{32})d H:z_6, H:z_{10}, H:z_{29}, H:z_{35}, v.v...	

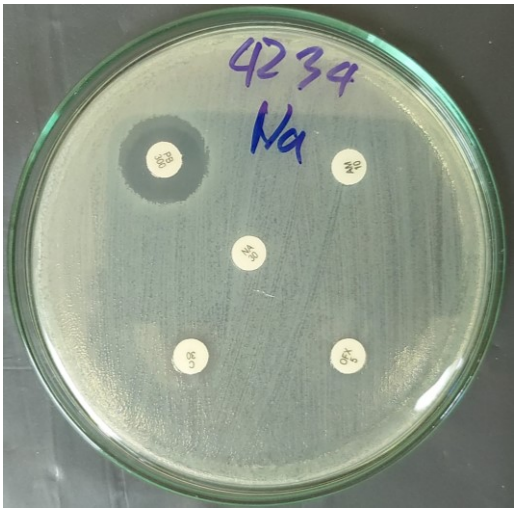
[a] Trong trường hợp âm tính với cả hai kháng huyết thanh đa giá thì phân lập tiếp với kháng huyết thanh đa giá hoặc nhóm kháng huyết thanh đặc hiệu cho phép nhận biết lên đến nhóm O:67 hoặc gửi chủng phân lập đến phòng thử nghiệm chuẩn.
[b] Nếu trong Bước 1 kháng huyết thanh đa giá của kháng thể khác với OMA và OMB được sử dụng thì kháng huyết thanh nhóm đặc hiệu trong bước 2 phải được sửa lại tương ứng.
[c] Có thể bỏ qua việc sử dụng kháng huyết thanh đa giá kháng H và chọn kháng huyết thanh đơn giá tương ứng với bằng chứng phân lập serovar của nhóm huyết thanh được ước tính.
[d] Kháng huyết thanh trong ngoặc đơn cần thiết để nhận biết các kháng nguyên của phức hợp kháng nguyên H tương ứng.

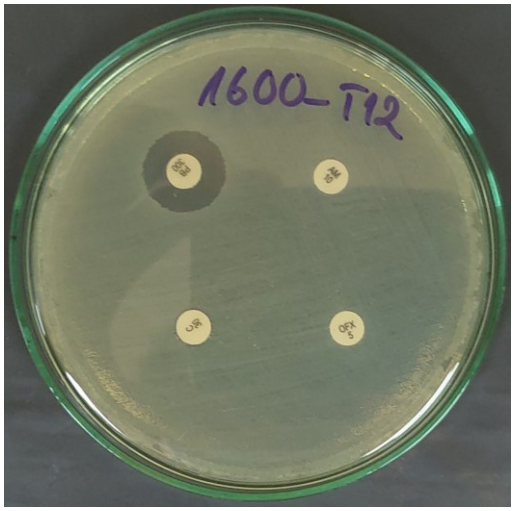
A8. Mức độ nhạy của vi khuẩn với một số kháng sinh (CLSI, 2018)

STT	Tên kháng sinh	Hàm lượng (μg)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)		
			Kháng (R)	Trung gian (I)	Nhạy (S)
1	Amoxicillin-clavulanate	AMC (20/10 μg)	≤13	14-17	≥18
2	Ampicillin	AMP (10 μg)	≤13	14-16	≥17
3	Ceftazidime	CAZ (30 μg)	≤17	18-20	≥21
4	Chloramphenicol	C (30 μg)	≤12	13-14	≥15
5	Nalidixic acid	NA (30 μg)	≤13	14-18	≥19
6	Ciprofloxacin	CIP (5 μg)	≤15	16-20	≥21
7	Ofloxacin	OFX (5 μg)	≤12	13-15	≥16
8	Gentamicin	GM (10 μg)	≤12	13-14	≥15
9	Streptomycin	STR (10 μg)	≤11	12-14	≥15
10	Tetracycline	TE (30 μg)	≤11	12-14	≥15
11	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	SXT (1.25/23.75 μg)	≤10	11-15	≥16

PHỤ LỤC B: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

B1. Hình ảnh kháng kháng sinh của các chủng *Salmonella* spp.





B2. Kiểu hình kháng kháng sinh chung của các chủng *Salmonella* spp.

Kiểu hình kháng kháng sinh	Số lượng kháng sinh kháng	Số chủng	Tỷ lệ (%)
AMP, CAZ, C, NA, CIP, OFX, GM, STR, TE, SXT	10	03	3,19
AMP, C, NA, CIP, OFX, GM, STR, TE, SXT	09	03	3,19
CAZ, C, NA, CIP, OFX, GM, STR, TE, SXT		01	1,06
AMP, C, NA, CIP, OFX, GM, STR, TE	08	02	2,13
AMC, AMP, C, NA, CIP, OFX, STR, TE		01	1,06
AMP, C, NA, CIP, GM, STR, TE, SXT		01	1,06
AMP, C, NA, CIP, OFX, STR, TE, SXT		01	1,06
AMP, C, NA, CIP, GM, STR, TE	07	01	1,06
AMC, AMP, CAZ, C, STR, TE, SXT		01	1,06
AMP, C, NA, GM, STR, TE, SXT		06	6,38
AMP, NA, CIP, GM, STR, TE, SXT		01	1,06
AMP, CIP, GM, STR, TE, SXT	06	01	1,06
AMP, C, NA, STR, TE, SXT		04	4,26
AMP, C, NA, CIP, OFX, SXT		01	1,06
AMP, C, NA, GM, STR, TE		01	1,06
AMP, C, NA, CIP, STR, TE		01	1,06
AMP, C, NA, STR, TE	05	02	2,13
AMP, C, STR, TE, SXT		04	4,26
AMP, C, NA, STR, SXT		01	1,06
AMP, GM, STR, TE, SXT		02	2,13
AMP, C, NA, TE, SXT		01	1,06

AMP, C, TE, SXT	04	08	8,51
AMP, CIP, TE, SXT		01	1,06
AMP, C, STR, TE		03	3,19
GM, STR, TE, SXT		01	1,06
AMP, C, NA, SXT		02	2,13
AMP, STR, TE, SXT		03	3,19
AM, NA, CIP, OFX		01	1,06
AMC, AMP, C, NA		01	1,06
AMP, STR, TE	03	03	3,19
C, STR, TE		01	1,06
C, TE, SXT		01	1,06
STR, TE, SXT		01	1,06
AMP, C, STR		01	1,06
AMP, TE, SXT		01	1,06
NA, SXT	02	01	1,06
AMC, TE		01	1,06
STR, TE		05	5,32
TE, SXT		01	1,06
AMP, TE		01	1,06
NA, TE		01	1,06
AMC	01	01	1,06
AMP		01	1,06
CAZ		01	1,06
C		02	2,13
GM		01	1,06
STR		01	1,06
TE		09	9,57
SXT		01	1,06

B3. Kiểu hình kháng của *Salmonella* spp. theo nguồn phân lập

Nguồn phân lập	Số chủng	Kiểu hình kháng kháng sinh
Thịt heo (38)	01	CAZ, C, NA, CIP, OFX, GM, STR, TE, SXT
	01	AMC, AMP, C, NA, CIP, OFX, STR, TE
	01	AMP, CIP, GM, STR, TE, SXT
	01	AMP, C, NA, STR, TE, SXT
	01	AMP, C, NA, STR, TE
	01	AMP, C, STR, TE, SXT
	05	AMP, C, TE, SXT
	01	AMP, CIP, TE, SXT
	01	AMP, C, STR, TE
	01	AMP, STR, TE
	01	NA, SXT

	01	AMC, TE
	01	STR, TE
	01	TE, SXT
	01	GM
	01	CAZ
	01	AMP
	04	TE
	01	C
Thịt gà (36)	02	AMP, CAZ, C, NA, CIP, OFX, GM, STR, TE, SXT
	02	AMP, C, NA, GM, STR, TE, SXT
	01	AMC, AMP, CAZ, C, STR, TE, SXT
	01	AMP, C, NA, GM, STR, TE
	02	AMP, C, NA, STR, TE, SXT
	01	AMP, C, NA, CIP, OFX, SXT
	01	AMP, C, NA, STR, SXT
	02	AMP, C, STR, TE, SXT
	01	GM, STR, TE, SXT
	01	AMP, C, NA, SXT
	03	AMP, C, TE, SXT
	02	AMP, C, STR, TE
	01	AMP, C, NA, SXT
	01	AMP, STR, TE, SXT
	01	AMP, STR, TE
	01	C, STR, TE
	01	C, TE, SXT
	01	STR, TE, SXT
	02	STR, TE
	01	C
Thịt bò (18)	01	AMP, C, NA, CIP, OFX, STR, TE, SXT
	01	AMP, C, STR, TE, SXT
	01	AMP, GM, STR, TE, SXT
	01	AMP, STR, TE
	02	STR, TE
	01	TE
Cá tươi (43)	01	AMP, CAZ, C, NA, CIP, OFX, GM, STR, TE, SXT
	03	AMP, C, NA, CIP, OFX, GM, STR, TE, SXT
	01	AMP, C, NA, CIP, GM, STR, TE, SXT
	02	AMP, C, NA, CIP, OFX, GM, STR, TE
	01	AMP, C, NA, GM, STR, TE, SXT
	01	AMP, C, NA, CIP, GM, STR, TE
	01	AMP, NA, CIP, GM, STR, TE, SXT
	03	AMP, C, NA, GM, STR, TE, SXT

	01	AMP, C, NA, CIP, STR, TE
	01	AMP, C, NA, STR, TE, SXT
	01	AMP, C, NA, STR, TE
	01	AMP, C, NA, TE, SXT
	01	AMP, STR, TE, SXT
	01	AMP, NA, CIP, OFX
	01	AMP, C, STR
	01	AMP, TE, SXT
	01	AMP, TE
	01	NA, TE
	01	AMC
	01	AMP
	01	STR
	04	TE
Mực tươi (05)	01	AMP, GM, STR, TE, SXT
	01	AMP, STR, TE, SXT
Tôm tươi (10)	01	AMC, AMP, C, NA
	01	SXT

B4. Mức độ kháng từng loại kháng sinh của các serovar

Serovar	Ký hiệu	Kháng sinh										
		AMC	AMP	CAZ	C	NA	CIP	OFX	GM	STR	TE	SXT
S. Kentucky	11/19 3497	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S
	11/19 3514	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
	12/19 501	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
	12/19 1600	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	02/20 1524	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
	07/20 1066	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	07/20 1067	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	08/20 2058	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
S. Indiana	11/19 4221	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S. Infantis	06/20 1809	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	S
	12/19 1584	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R
	07/20 3335	S	R	S	R	R	R	R	I	R	R	R
	05/20 210	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R
S. Agona	11/19 3498	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R
	06/20 1808	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R
S. Saintpaul	11/19 3515	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R
S. Braenderup	11/19 4205	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R
S. Potsdam	01/20 66	S	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R
	05/20 1114	I	R	S	R	R	I	I	R	R	R	R
OMF:1,z_6:UT[a]	07/20 460	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
7:1,z_6:UT[a]	07/20 462	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R

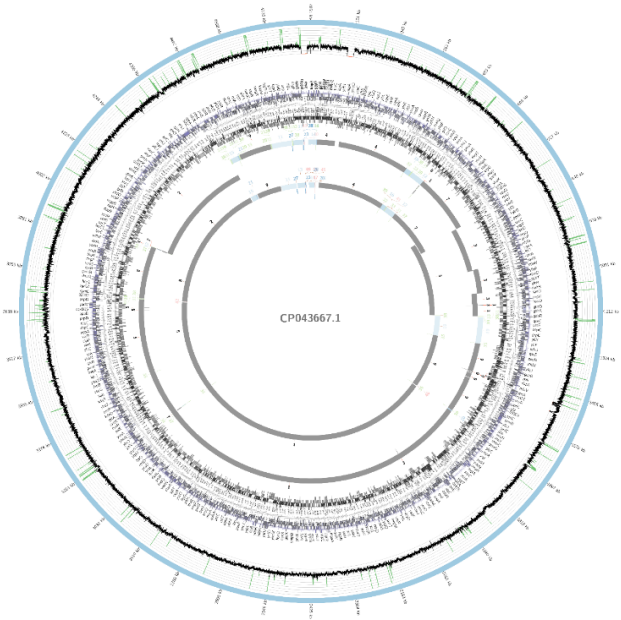
B5. Tỷ lệ xuất hiện các loại plasmid theo kiểu gen kháng của *Salmonella*

Loại plasmid	*bla*TEM n=11		*bla*CTX n=4		*tet* n=20		*cml* n=02		*str* n=11		*aad* n=13		*gyr* n=21		*par* n=21		*sul* n=13		*dhfr* n=5	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
N	09	81,82	04	100,00	17	85,00	02	100,00	09	81,82	12	92,31	18	85,74	18	85,74	12	92,31	05	100,00
FIB	02	18,18	00	00	02	10,00	01	50,00	02	18,18	00	00	02	9,52	02	9,52	00	00	01	20,00
W	11	100,00	04	100,0	20	100,00	02	100,00	11	100,00	13	100,00	21	100,00	21	100,00	13	100,00	05	100,00
Y	11	100,00	04	100,00	20	100,00	02	100,00	11	100,00	13	100,00	21	100,00	21	100,00	13	100,00	05	100,00
P	02	18,18	00	0	07	35,00	01	50,00	02	18,18	05	38,46	08	38,10	08	38,10	06	38,46	01	20,00
A/C	05	45,45	01	25,00	06	30,00	02	100,00	05	45,45	04	30,77	06	28,57	06	28,57	01	30,77	01	20,00
T	07	63,64	03	75,00	13	65,00	00	00	07	63,64	11	84,62	14	66,67	14	66,67	09	84,62	04	80,00
Frepb	01	9,09	00	00	01	5,00	01	50,00	01	9,09	00	00	01	4,76	01	4,76	00	00	00	00
K/B	01	9,09	00	00	01	5,00	00	00	01	9,09	01	7,69	01	4,76	01	4,76	01	7,69	00	00
B/O	01	9,09	00	00	01	5,00	00	0	01	9,09	01	7,69	01	4,76	01	4,76	01	7,69	00	00

B6. Số lượng plasmid phân bổ theo kiểu gen kháng của vi khuẩn *Salmonella*

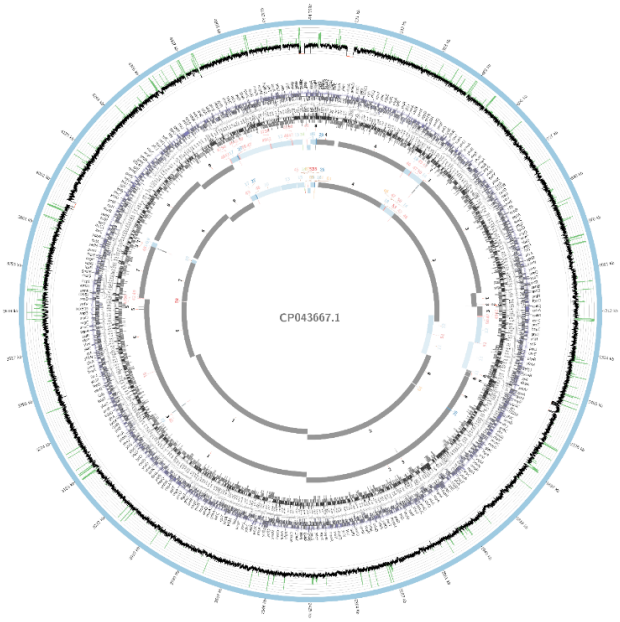
Số lượng plasmid	*bla*TEM n=11		*bla*CTX n=4		*tet* n=20		*cml* n=02		*str* n=11		*aad* n=13		*gyr* n=21		*par* n=21		*sul* n=13		*dhfr* n=5	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
06	02	18,18	00	0	02	10,00	01	50,00	02	18,18	01	7,69	02	9,52	02	9,52	01	7,69	00	00
05	04	36,36	01	25,00	08	40,00	01	50,00	04	36,36	07	53,85	08	38,10	08	38,10	04	30,77	03	60,00
04	03	27,27	02	50,00	07	35,00	00	00	03	27,27	04	30,77	08	38,10	08	38,10	06	46,15	01	20,00
03	02	18,18	01	25,00	03	15,00	00	00	02	18,18	01	7,69	03	14,29	03	14,29	02	15,38	01	20,00
0	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00

B7. Kết quả so sánh cấu trúc lắp ráp các contigs của SA11/19 3497 với chủng tham chiếu có mã số CP043667.1



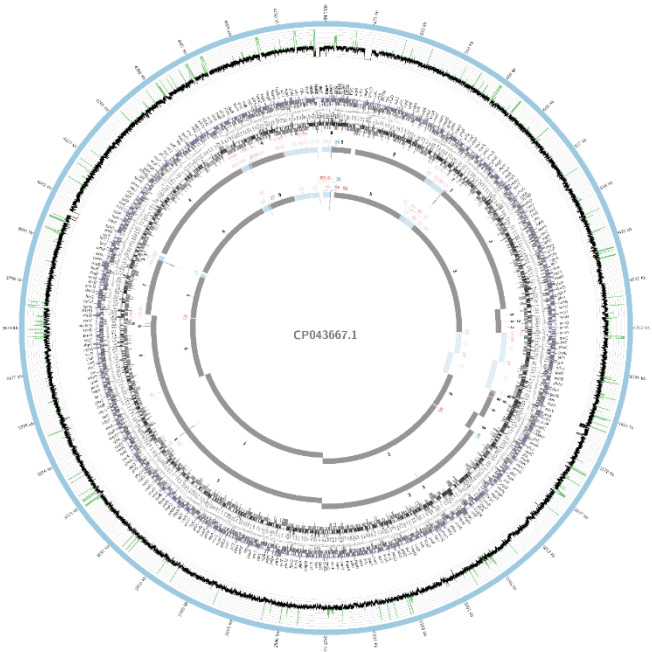
(Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky strain 162835 chromosome, complete genome)

B8. Kết quả so sánh cấu trúc lắp ráp các contigs của SA12/19 1600 với chủng tham chiếu có mã số CP043667.1



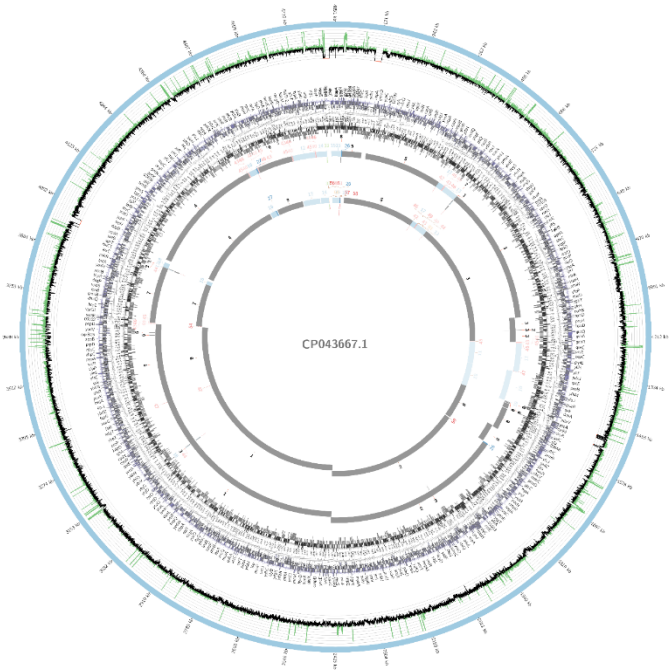
(Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky strain 162835 chromosome, complete genome)

B9. Kết quả so sánh cấu trúc lắp ráp các contigs của SA07/20 1066 với chủng tham chiếu có mã số CP043667.1



(Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky strain 162835 chromosome, complete genome)

B10. Kết quả so sánh cấu trúc lắp ráp các contigs của SA07/20 1067 với chủng tham chiếu có mã số CP043667.1

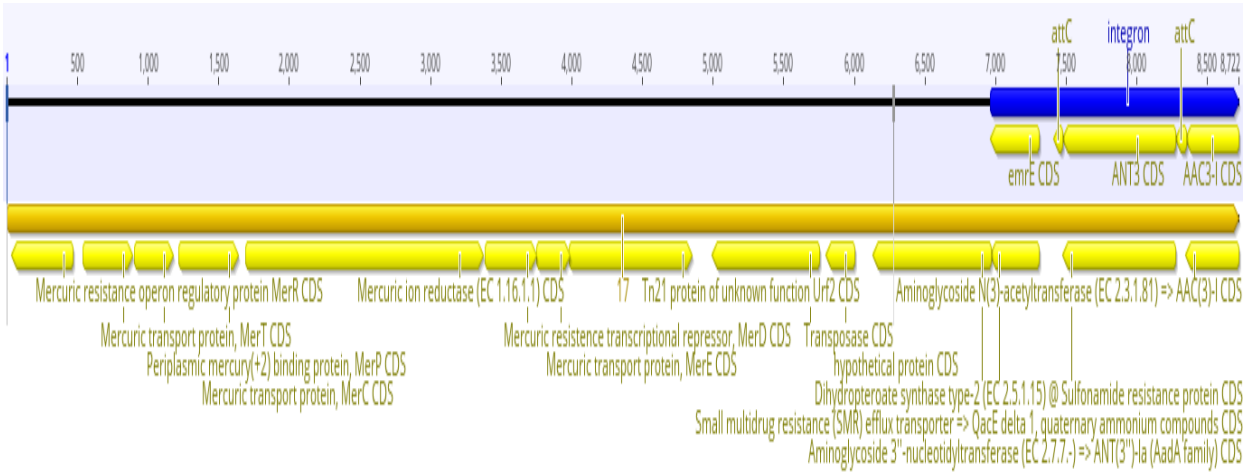


(Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky strain 162835 chromosome, complete genome)

B11. Các vùng integron được xác định của SA12/19 3497

ID_integron	Contigs	Pos_beg	Pos_end	Strand	Type	Annotation
integron_01	17	6963	7310	-1	protein	emrE
integron_01	17	7413	7472	-1	attC	attC
integron_01	17	7474	8271	-1	protein	ANT3
integron_01	17	8275	8352	-1	attC	attC
integron_01	17	8347	8721	-1	protein	AAC3-I

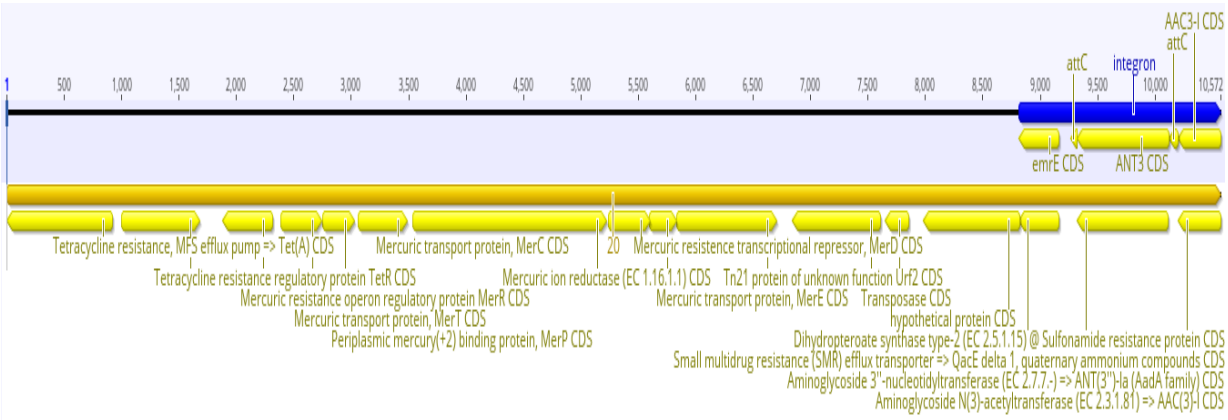
Vị trí integron trên contig 17



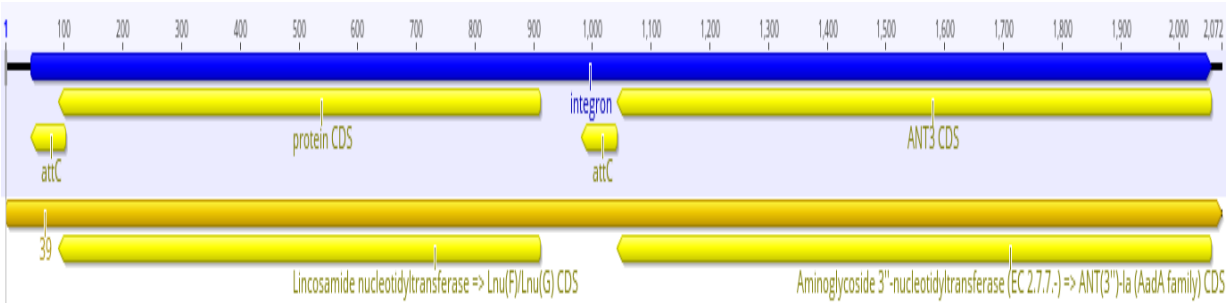
B12. Các vùng integron được xác định của SA12/19 1600

ID_integron	Contigs	Pos_beg	Pos_end	Strand	Type	Annotation
integron_01	20	8813	9160	-1	protein	emrE
integron_01	20	9263	9322	-1	attC	attC
integron_01	20	9324	10121	-1	protein	ANT3
integron_01	20	10125	10202	-1	attC	attC
integron_01	20	10197	10571	-1	protein	AAC3-I
integron_01	39	43	102	-1	attC	attC
integron_01	39	90	911	-1	protein	protein
integron_01	39	982	1041	-1	attC	attC
integron_01	39	1043	2053	-1	protein	ANT3
integron_01	40	237	719	1	protein	protein
integron_01	40	714	799	1	attC	attC
integron_01	40	830	1282	1	protein	protein
integron_01	40	1134	1234	1	attC	attC
integron_01	40	1289	1402	1	attC	attC

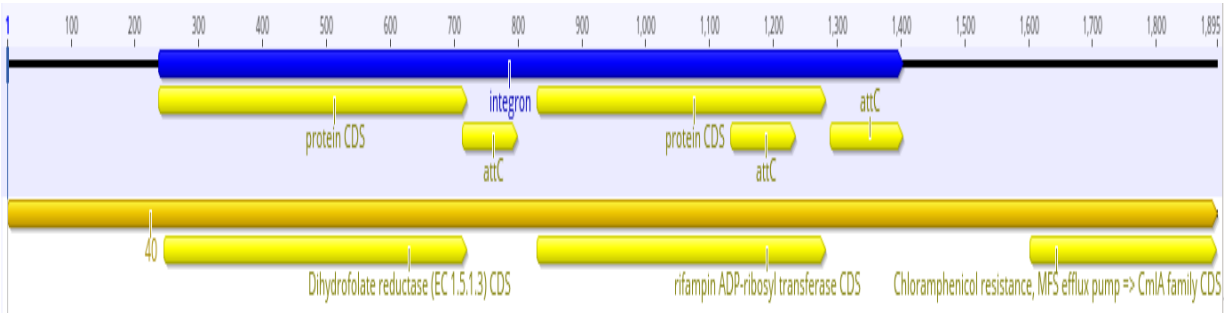
Vị trí integron trên contig 20



Vị trí integron trên contig 39



Vị trí integron trên contig 40

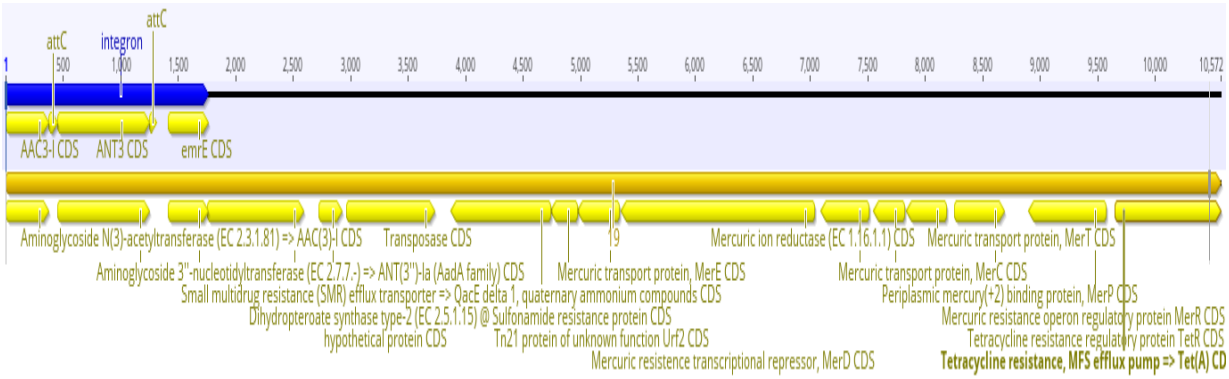


B13. Các vùng integron được xác định của SA07/20 1066 và 1067

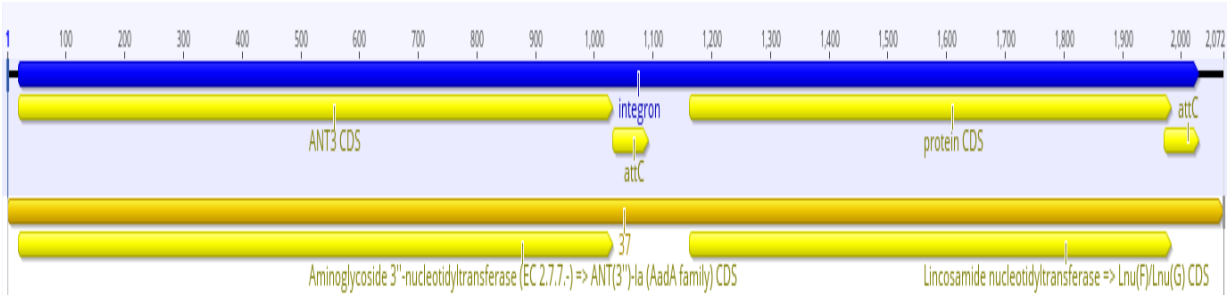
ID_integron	Contigs	Pos_beg	Pos_end	Strand	Type	Annotation
integron_01	19	2	376	1	protein	AAC3-I
integron_01	19	371	448	1	attC	attC
integron_01	19	452	1249	1	protein	ANT3
integron_01	19	1251	1310	1	attC	attC
integron_01	19	1413	1760	1	protein	emrE
integron_01	37	20	1030	1	protein	ANT3
integron_01	37	1032	1091	1	attC	attC
integron_01	37	1162	1983	1	protein	protein

integron_01	37	1971	2030	1	attC	attC
integron_01	38	237	719	1	protein	protein
integron_01	38	714	799	1	attC	attC
integron_01	38	830	1282	1	protein	protein
integron_01	38	1134	1234	1	attC	attC
integron_01	38	1289	1402	1	attC	attC

Vị trí integron trên contig 19



Vị trí integron trên contig 37



Vị trí integron trên contig 38

