

XÁC ĐỊNH SỰ HIỆN DIỆN CỦA *SALMONELLA* VÀ GEN ĐỘC TỐ ĐƯỜNG RUỘT (*Stn*) PHÂN LẬP TỪ TRỨNG GÀ

Nguyễn Thị Đông Phương¹, Đặng Ngọc Phương Uyên¹, Tạ Đặng Ý Vi², Huỳnh Văn Chương^{2*}

¹Bộ môn Công nghệ Thực phẩm - Khoa Hóa – Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

² Phòng Thí nghiệm Miễn dịch học và Vắc xin - Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Trứng gà là loại thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao, được tiêu thụ rộng rãi bởi các lứa tuổi và cũng là loại thực phẩm có nguy cơ gây ngộ độc thực phẩm do tác nhân xâm nhiễm chủ yếu là các loài *Salmonella* spp.. Trong nghiên cứu này, 60 mẫu trứng gà được thu thập từ một số địa điểm trong chuỗi cung ứng trứng tại thành phố Huế để kiểm tra sự có mặt của *Salmonella* trên vỏ trứng, lòng trắng và lòng đỏ. Kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở vỏ trứng trung bình là 58%, đặc biệt là, các mẫu trứng thu thập tại các nông hộ và tại nhà phân phối cho tỷ lệ nhiễm đến 80%. Tỷ lệ nhiễm khuẩn ở lòng trắng trứng và lòng đỏ trứng lần lượt là 23% và 25%. Điều này cho thấy các chủng *Salmonella* có thể xâm nhiễm từ gà mái bị bệnh hoặc từ vỏ trứng đi vào bên trong lòng trắng và lòng đỏ trứng. Ngoài ra, các chủng *Salmonella* phân lập được từ các mẫu trứng đều mang gene *Stn* quy định yếu tố độc lực ảnh hưởng đến sức khỏe của con người.

Từ khóa: Chuỗi cung ứng trứng, gene *Stn*, *Salmonella*, trứng gà, yếu tố độc lực.

MỞ ĐẦU

Trứng gà là một trong những loại thực phẩm được tiêu thụ rộng rãi trên khắp thế giới. Thành phần của trứng gồm 32-35% lòng đỏ, 52-58% lòng trắng và 9-14% vỏ trứng. Trứng chứa đầy đủ các thành phần dinh dưỡng với tỷ lệ cân đối chất đạm, chất béo, vitamin và khoáng chất, đồng thời cung cấp một lượng calo vừa phải (khoảng 150 kcal/100 g). Do đó, trứng được xem là nguồn dinh dưỡng bổ sung trong chế độ ăn uống cho mọi lứa tuổi (Miranda *et al.*, 2015). Tuy là một loại thực phẩm giàu dưỡng chất và có lợi cho sức khỏe nhưng trứng lại nằm trong nhóm có nguy cơ cao gây ngộ độc thực phẩm, đặc biệt là do sự xâm nhập và phát triển của các mầm bệnh thực phẩm, trong số đó phổ biến nhất là các loài vi khuẩn *Salmonella* (Rahman *et al.*, 2019).

Salmonella thuộc họ vi khuẩn Enterobacteriaceae (vi khuẩn đường ruột) có dạng hình que, thuộc nhóm trực khuẩn gram âm, kỵ khí tùy nghi, không sinh bào tử, có khả năng di động nhờ tiên mao và sinh sống chủ yếu trong đường ruột. Ở trứng, *Salmonella* lây nhiễm vào bên trong lòng trắng và lòng đỏ trứng theo hai con đường là lây nhiễm theo chiều ngang và theo chiều dọc. Trong quá trình xâm nhiễm theo chiều ngang, mầm bệnh từ ruột bị nhiễm khuẩn hoặc từ phân bị nhiễm khuẩn xâm nhập vào bên trong qua bề mặt của vỏ trứng, trong khi xâm nhiễm theo chiều dọc là do nhiễm khuẩn trực tiếp vào lòng đỏ, lòng trắng, màng vỏ trứng hoặc vỏ trứng từ cơ quan sinh sản của gà bị nhiễm bệnh khi trứng đang hình thành (Gantois *et al.*, 2009). Hiện nay, tình trạng ngộ độc thực phẩm diễn ra ngày càng thường xuyên hơn dẫn đến mối quan tâm của người tiêu dùng đến các chỉ tiêu an toàn thực phẩm càng lớn. *Salmonella* là chỉ tiêu được đặc biệt được chú ý vì khả năng gây bệnh cho người qua con đường thực phẩm. Khi xâm nhập vào cơ thể con người, chúng có khả năng gây ra nhiều bệnh nguy hiểm như sốt phó thương hàn, nhiễm khuẩn huyết, viêm đại tràng và nhiễm trùng khu trú (Rahman *et al.*, 2019). Nhiều vụ ngộ độc nghiêm trọng có thể dẫn đến tử vong có nguyên nhân bắt nguồn từ thực phẩm nhiễm *Salmonella* (El-Saadony *et al.*, 2022). Theo các yêu cầu về vệ sinh an toàn thực phẩm của hầu hết các nước trên thế giới và tại Việt Nam đều không cho phép sự có mặt của *Salmonella* trong 25 g hoặc 25 mL trứng hoặc các sản phẩm thực phẩm có nguồn gốc từ trứng (EC, 2007; QCVN, 2012). Cùng với điều kiện tự nhiên đặc thù khí hậu nhiệt đới ẩm, quy trình sản xuất đảm bảo từ trang trại đến bàn ăn của Việt Nam còn thô sơ, thiếu tính nhất quán càng làm tăng nguy cơ lây nhiễm *Salmonella* gây mất an toàn vệ sinh thực phẩm cho người sử dụng. Hiện nay, có ít tài liệu nghiên cứu thống kê về mức độ lây nhiễm *Salmonella* trên trứng tại các địa phương hoặc trên quy mô toàn quốc. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục đích làm rõ tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trên vỏ trứng gà và các thành phần của trứng gà được thu thập tại một số cơ sở cung cấp trứng ở địa bàn thành phố Huế, ngoài ra còn sử dụng kỹ thuật PCR để xác định yếu tố độc lực gây rối loạn đường ruột được quy định gene *Stn* của vi khuẩn *Salmonella* phân lập được để đánh giá rõ hơn về nguy cơ lây nhiễm gây ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên vật liệu

Tổng số 60 mẫu trứng gà được thu thập từ tháng 6-10 năm 2022 tại một số trang trại, hộ chăn nuôi, nhà cung cấp trứng, các chợ và siêu thị thuộc địa bàn thành phố Huế (bảng 2). Sử dụng găng tay vô trùng để lấy mẫu trứng và chuyển trứng vào túi zip vô trùng, ghi lại thời gian, địa điểm, ký hiệu mẫu... Mẫu sau khi lấy được cho vào thùng giấy có lót giấy tránh sự va chạm làm nứt vỏ trứng. Sau đó được vận chuyển nhanh về phòng thí nghiệm Miễn dịch học và vaccine- Viện Công nghệ Sinh Học, Đại Học Huế để tiến hành phân tích trong 24-48 giờ.

Nuôi cấy và phân lập *Salmonella*

Trứng gà được xử lý lần lượt để thu các mẫu vi khuẩn từ vỏ trứng, lòng trắng và lòng đỏ trứng. Đối với vỏ trứng, dùng gạc vô trùng thấm môi trường tăng sinh không chọn lọc LB (Luria Bertani Broth, Himedia) lau xung quanh vỏ trứng rồi cho vào ống nghiệm chứa 9 mL môi trường LB lỏng. Đối với lòng trắng, tiến hành khử trùng vỏ trứng bằng cồn 70%, dùng dao vô trùng tách vỏ trứng, tách cẩn thận lòng trắng và lòng đỏ trứng riêng cho vào các cốc vô trùng. Tiến hành khuấy đều bằng đũa thủy tinh vô trùng để đồng hóa mẫu. Dùng pipet hút 1 mL mẫu đã được đồng hóa cho vào các ống nghiệm chứa 9 mL môi trường LB lỏng. Lắc đều các ống nghiệm rồi tiến hành nuôi tiên tăng sinh trong tủ ấm ở 37°C trong 24 giờ.

Sau 24 giờ, các mẫu đã tiên tăng sinh được chuyển sang giai đoạn tăng sinh trong môi trường tăng sinh chọn lọc RV (Rappaport Vassiliadis, Himedia MH1491) và tiếp tục nuôi trong tủ ấm ở 37°C trong 24 giờ với mục đích ức chế sự sinh trưởng các nhóm vi khuẩn khác tạo thuận lợi cho sự phân lập *Salmonella* (Rahman *et al.*, 2019). Sau khi tăng sinh, tiến hành phân lập *Salmonella* spp. trên môi trường chọn lọc là HiCrome™ Improved *Salmonella* Agar (Himedia, India). Nhờ vào môi trường có sử dụng chất tạo màu và thuốc nhuộm chỉ thị giúp dễ dàng nhận dạng và phân biệt các loài *Salmonella*. Hầu hết khuẩn lạc *Salmonella* sinh trưởng trong môi trường này có màu hồng đến đỏ (Al-Wasify *et al.*, 2011). Các khuẩn lạc *Salmonella* giả định được cấy chuyển và sử dụng một số phản ứng hóa sinh thích hợp để khẳng định chúng thuộc *Salmonella* spp. Lựa chọn 3-4 khuẩn lạc trên đĩa thạch, tiến hành các phản ứng sinh hóa bao gồm nuôi cấy trên môi trường TSI, phản ứng indol, urea, phản ứng methyl red, Voges-Proskauer, citrate, motility, coagulase catalase, oxidase và các loại đường (TCVN 10780-1:2017).

Xác định yếu tố độc lực bằng phản ứng PCR

Tách chiết DNA

Trước khi tiến hành tách chiết, đối với mỗi mẫu, lấy một khuẩn lạc ngẫu nhiên từ 3-4 khuẩn lạc đã khẳng định thuộc *Salmonella* spp. bằng các thử nghiệm hóa sinh đem nuôi tăng sinh trong ống nghiệm chứa 5 mL môi trường LB ở 37°C trong 24 h. Sau đó thực hiện ly tâm ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ phần dịch nổi và rửa vi khuẩn hai lần bằng dung dịch đệm PBS (Phosphate Buffered Saline), đảo trộn và hút cho vào eppendorf 1,5 mL. Sử dụng phương pháp tách chiết bằng kit tách chiết Food DNA Extraction ViSiKit (Visitech). Mẫu đã tách chiết DNA được sử dụng ngay hoặc bảo quản ngay ở -20°C.

Thăm dò gene *Stn* (độc tố đường ruột)

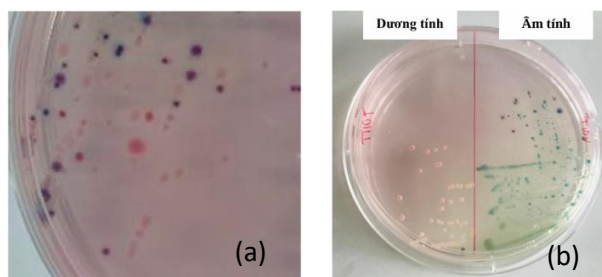
Cặp mồi sử dụng để xác định gene *Stn* (Mã hóa khả năng sản sinh độc tố đường ruột của vi khuẩn *Salmonella*) có trình tự là F-CTTTGGTTCGATAAATAAGGCG và R-TGCCCAAAGCAGAGAGATTC. Ứng dụng kỹ thuật PCR theo Chaudhary và đồng tác giả (2015) để xác định gene mã hóa *Stn* của DNA đã tách chiết từ các vi khuẩn *Salmonella* phân lập được.

Chuẩn bị mỗi mẫu phản ứng có thể tích 25 µL bao gồm 12,5 µL PCR Master Mix (2X), 1 mỗi loại primer (3,2 µM /µL), 2 µL mỗi loại DNA sử dụng, nước cất vừa đủ 25 µL cho một phản ứng. Tiến hành phản ứng trong máy PCR theo các giai đoạn: tiên biến ở 94°C/ 1 phút và 35 chu kỳ nhiệt (biến tính 94°C/1 phút, ủ bắt cặp mồi trong 30 s, kéo dài 72°C/1 phút), và kéo dài cuối cùng ở 72°C/7 phút. Chạy điện di sản phẩm PCR: sản phẩm PCR (gene *Stn*) thu được sau chu trình phản ứng được nhuộm với chất nhuộm nhỏ mẫu (6X Gelgreen), trộn vào mẫu theo tỉ lệ 1:5. Sau khi nhuộm sản phẩm PCR được chạy điện di trên Gel Agarose 2% trong dung dịch đệm TAE (Tris-Acetate EDTA) với hiệu điện thế 60 V trong 30 phút. Đọc kết quả bằng cách quan sát dưới đèn UV (300 nm) và chụp ảnh. Kích thước các băng DNA được so với DNA chuẩn (DNA marker).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở vỏ trứng gà

Để đánh giá mức độ ô nhiễm *Salmonella* trên trứng gà tại một số địa điểm được lựa chọn ngẫu nhiên trong chuỗi cung ứng trứng trên địa bàn thành phố Huế, chúng tôi đã tiến hành thu thập 60 quả trứng gà từ 2 trang trại, 2 nông hộ, 4 chợ, 2 nhà phân phối và 2 siêu thị để kiểm tra sự xuất hiện của *Salmonella* spp. trên bề mặt vỏ trứng, lòng trắng và lòng đỏ trứng theo trình tự nuôi cấy và phân lập *Salmonella* đã nêu. Đối với môi trường HiCrome™ Improved *Salmonella* Agar dựa trên việc sử dụng propylene glycol, natri deoxycholate ức chế vi khuẩn gram dương và sự có mặt của chất chỉ thị tạo màu, thuốc nhuộm chỉ thị để nhận dạng và phân biệt các loài *Salmonella*.



Hình 1. Nuôi cấy phân lập (a) và tăng sinh chọn lọc (b) *Salmonella* trên môi trường HiCrome™ Improved *Salmonella* Agar

Tất cả các loài *Salmonella* được phân lập từ thực phẩm hoặc mẫu lâm sàng đều có khuẩn lạc màu hồng đến đỏ một số ít chủng có khuẩn lạc không màu. Trong khi vi khuẩn *E. coli* có màu từ xanh lam đến tím đặc trưng do có mặt enzyme đặc hiệu cho chất nền tạo màu (hình 1a). Quan sát hình thái khuẩn lạc khi cấy ria vi khuẩn đã được nuôi tăng sinh từ các mẫu thu thập được, những mẫu xuất hiện khuẩn lạc màu trắng, hồng đến đỏ là những mẫu nghi ngờ dương tính với *Salmonella*, nuôi tăng sinh các khuẩn lạc trên để tiến hành kiểm tra sinh hóa. Ngược lại với các mẫu chỉ xuất hiện các khuẩn lạc xanh hoặc tím, hoặc không xuất hiện khuẩn lạc nào khi cấy ria lên đĩa thạch HiCrome™ Improved *Salmonella* Agar thì được cho là âm tính, và mẫu ban đầu này không có *Salmonella* (hình 1b). Các kiểm tra hóa sinh tiếp theo đối với các chủng dương tính cho kết quả các chủng này có những đặc trưng của loài *Salmonella* (bảng 1), các kết quả này tương tự kết quả của Rahman và đồng tác giả (2019) khi phân lập và kiểm tra hóa sinh định danh các loài *Salmonella* ở các mẫu trứng.

Bảng 1. Kết quả phản ứng sinh hóa của *Salmonella* spp.

STT	Chỉ tiêu	Kết quả	STT	Chỉ tiêu	Kết quả
1	H ₂ S (TSI)	+	8	Coagulase	+
2	Indol	-	9	Khả năng di động	+
3	Methyl red	-	10	Citrate	-
4	Catalase	+	11	Sucrose	-
5	Urea	-	12	Glucose	+
6	Voges Proskauer	-	13	Mantose	+
7	Oxidase reaction	-	14	Lactose	-

Từ quá trình phân lập và kiểm tra hóa sinh cơ bản liên quan đến loài *Salmonella*, kết quả về tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trên vỏ trứng được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trên bề mặt vỏ trứng

STT	Nơi thu mẫu	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu nhiễm	Tỷ lệ nhiễm <i>Salmonella</i> (%)
1	Trang trại	10	5	50
2	Nông hộ	10	8	80
3	Nhà phân phối	10	8	80
4	Chợ	20	9	45
5	Siêu thị	10	5	50
Tổng cộng		60	35	58

Ở các địa điểm thu mẫu là nông hộ (hộ gia đình chăn nuôi gà cầm nhỏ lẻ) và nhà phân phối sỉ (thu mua từ trứng từ các nông hộ), tỷ lệ nhiễm *Salmonella* lên đến 80%, trong khi đó ở các trang trại và siêu thị có tỷ lệ nhiễm ngang nhau (50%), và cuối cùng là các chợ với tỷ lệ nhiễm là 45%. Nông hộ và nhà phân phối có tỷ lệ nhiễm cao nhất có thể do điều kiện vệ sinh khu vực chăn nuôi và thu hoạch trứng gà còn kém, nguồn lây nhiễm *Salmonella* từ phân gà, ổ lót trứng có thể dính trực tiếp vào trứng gà. Trứng sau khi thu hoạch được các nhà phân phối thu mua mà chưa đảm bảo vệ sinh kỹ lưỡng môi trường, dụng cụ vận chuyển, vệ sinh cá nhân và thao tác vận chuyển nên tỷ lệ nhiễm *Salmonella* vẫn còn rất cao ở các nhà phân phối. Tại các chợ và siêu thị, trứng đã được làm sạch ngoài vỏ nên tỉ lệ nhiễm *Salmonella* ở trứng gà thu thập ở chợ và siêu thị thấp hơn (45-50%) so với các địa điểm thu thập khác, tuy nhiên khi so sánh với kết quả của Trần và đồng tác giả (2023), tỷ lệ mẫu nhiễm ở trứng thu thập tại các siêu thị ở thành phố Hồ Chí Minh chỉ là 9,5%. Đối với các trang trại nuôi gà tập trung phục vụ cho việc thu hoạch trứng, tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở vỏ trứng là 50% do trang trại có sự đầu tư về trang thiết bị, có quy trình khử trùng chuồng trại thường xuyên, tuy nhiên vẫn phát hiện nhiễm ở một số mẫu trứng có thể do quá trình thu hoạch người thu hoạch chưa vệ sinh cá nhân kỹ, gây ra sự lây nhiễm từ khu vực chăn nuôi này sang khu vực khác. Có thể thấy rằng các địa điểm thu mẫu ngẫu nhiên trên địa bàn thành phố Huế đều có trứng gà nhiễm vi khuẩn *Salmonella* trên vỏ trứng với tỷ lệ trung bình là 58%. Thời gian thu mẫu cũng ảnh hưởng đến tỷ lệ nhiễm *Salmonella*, chúng tôi tiến hành thu mẫu vào khoảng thời gian từ tháng 6 -10, khi nhiệt độ và độ ẩm ở mức cao tạo điều kiện thuận lợi cho các vi sinh vật phát triển, đặc biệt là các loại vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm. Điều này giải thích mức độ nhiễm *Salmonella* cao ở các mẫu trứng thu được tại một số địa điểm ở thành phố Huế.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Salmonella* trên vỏ trứng ở trang trại (50%) tương đồng với tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trong nghiên cứu của Vân và đồng tác giả (2019) về sự nhiễm bẩn vỏ trứng vịt trong điều kiện chăn nuôi tập trung tại tỉnh Hà Tĩnh là 34,67% đến 63%. Tỷ lệ nhiễm trung bình là 58% trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với kết quả của Mai và đồng tác giả (2011) khi đánh giá tình hình nhiễm

Salmonella trên vỏ trứng gà địa bàn thành phố Cần Thơ (40%). Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở trứng tại các quốc gia trên thế giới rất khác nhau và đa số thấp hơn nhiều so với các kết quả điều tra tại Việt Nam, theo Owen (2016) tình hình nhiễm *Salmonella* trên trứng ở Anh chiếm tỷ lệ 1,4%, trong khi đó ở Iran có tỷ lệ nhiễm chỉ ở mức 1,33% (Moonsavy *et al.*, 2015). Cá biệt, ở theo điều tra của Rahman và đồng tác giả (2019) thì tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trên vỏ trứng là 100% khi thu thập 50 mẫu trứng tại các trang trại và chợ ở khu vực Sarva, Bangladesh (Rahman *et al.*, 2019).

Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở lòng trắng và lòng đỏ trứng gà

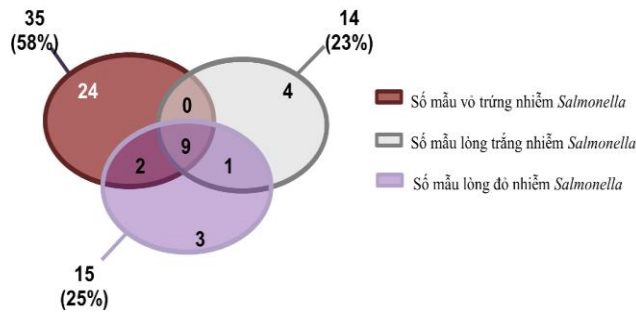
Salmonella có thể xâm nhiễm vào bên trong lòng trắng và lòng đỏ trứng theo 2 con đường là lây nhiễm theo chiều ngang và lây nhiễm theo chiều dọc (Gantois *et al.*, 2009). Do vậy, việc đánh giá tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trong lòng trắng trứng và lòng đỏ trứng là những số liệu quan trọng cho chỉ tiêu vệ sinh an toàn thực phẩm. Chúng tôi tiến hành nuôi cấy mẫu dịch trứng của cả lòng trắng và lòng đỏ của 60 mẫu trứng đã thu thập, kết quả thể hiện trên bảng 3.

Kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Salmonella* ở lòng trứng thấp hơn nhiều so với trên vỏ trứng, trong khoảng 23-25%. Tỷ lệ nhiễm này cao nhất tại các nhà phân phối với 40%, tỷ lệ nhiễm thấp hơn ở các chợ và siêu thị và tỷ lệ nhiễm thấp nhất ở các trang trại và nông hộ với chỉ 10%. Khác với vỏ trứng, tỷ lệ lây nhiễm *Salmonella* có trong lòng trắng và lòng đỏ trứng tương đối thấp nhờ cơ chế tự bảo vệ của trứng, được bao bọc bằng các lớp vỏ vôi và màng lụa, cùng đặc tính kháng khuẩn của lòng trắng trứng nên hạn chế được sự lây nhiễm *Salmonella* vào bên trong trứng (Gantois *et al.*, 2009). Trứng gà thu thập từ các trang trại và nông hộ có tỷ lệ nhiễm rất thấp nhờ cơ chế tự bảo vệ của trứng gà vừa đẻ, các trứng thu mua từ chợ, nhà phân phối và siêu thị đã được lưu trữ trong thời gian dài, có thể điều kiện vận chuyển và bảo quản không phù hợp nên nguy cơ lây nhiễm theo chiều ngang rất cao, tỷ lệ trứng nhiễm *Salmonella* thu thập từ những khu vực này cao hơn hẳn so với trang trại và nông hộ. Vì vậy chúng tôi nhận thấy rằng cần chú ý điều kiện bảo quản trứng và trứng cần được tiêu thụ trong thời gian ngắn nhất kể từ khi sinh ra đến trước ngày hết hạn.

Bảng 3. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở lòng đỏ và lòng trắng trứng

STT	Nơi thu mẫu	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu nhiễm (lòng trắng)	Tỷ lệ nhiễm <i>Salmonella</i> (%) ở lòng trắng	Số mẫu nhiễm (lòng đỏ)	Tỷ lệ nhiễm <i>Salmonella</i> (%) ở lòng đỏ
1	Trang trại	10	1	10	1	10
2	Nông hộ	10	1	10	1	10
3	Nhà phân phối	10	4	40	4	40
4	Chợ	20	7	35	6	33
5	Siêu thị	10	1	10	3	30
		60	14	23	15	25

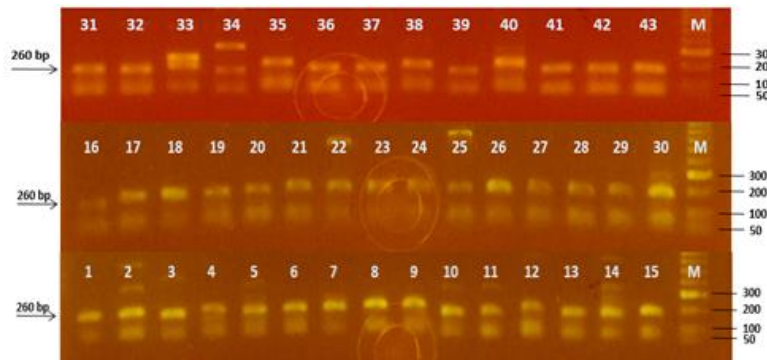
Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* tại các vị trí trên trứng gà được thể hiện ở hình 2. Sơ đồ tập hợp Venn về tỷ lệ nhiễm *Salmonella* tại các vị trí nhiễm trên trứng gà từ các mẫu thu thập được cho thấy *Salmonella* lây nhiễm nhiều nhất ở vỏ trứng. Tỷ lệ ô nhiễm của *Salmonella* trong lòng trắng và lòng đỏ trứng gà khá tương đồng nhau. Kết quả này cho thấy vỏ trứng thường dễ dàng nhiễm *Salmonella* hơn do ảnh hưởng của nhiều yếu tố, có thể do sự tiếp xúc giữa trứng với phân gà bị ô nhiễm, không khí và môi trường ô nhiễm ở khu vực chăn nuôi hoặc trong quá trình vận chuyển, phân phối trứng đến thị trường. Lòng trắng và lòng đỏ trứng có tỷ lệ nhiễm tương đương nhau và xuất hiện nhiều ở các mẫu trứng cũ có thể cho thấy sự lây nhiễm theo chiều ngang của *Salmonella* lây nhiễm từ bên ngoài vỏ vào bên trong trứng, sự lây nhiễm này ít xuất hiện ở những quả trứng mới được thu hoạch, vì vậy để giữ chất lượng và an toàn khi sử dụng các sản phẩm từ trứng gà cần được tiêu thụ trong thời gian ngắn nhất, đặc biệt đối với trứng gà ít được bảo quản tốt như trứng thu mua ở chợ và nhà phân phối. Trứng phải được bán 7 ngày trước khi hết hạn (28 ngày sau khi trứng được đẻ) (Cardoso *et al.*, 2021). Một điểm đáng chú ý trong kết quả mà chúng tôi thu nhận được là có một số mẫu nhiễm *Salmonella* ở lòng đỏ hoặc lòng trắng thì không xuất hiện *Salmonella* trên vỏ trứng trong cùng một quả trứng. Cụ thể là, 10 quả trứng thu nhận ngẫu nhiên ở các trang trại thì có 1 mẫu lòng đỏ và 1 mẫu lòng trắng nhiễm *Salmonella* nhưng mẫu vỏ trứng từ quả trứng đó không bị nhiễm. Trong 10 quả trứng thu nhận tại các siêu thị thì có 1 mẫu lòng đỏ bị nhiễm *Salmonella*, còn lòng trắng và vỏ của quả trứng đó thì không bị nhiễm. Trong 20 quả trứng thu nhận tại các chợ thì có 4 mẫu lòng trắng và 2 lòng đỏ bị nhiễm. Điều này chứng tỏ *Salmonella* không chỉ xâm nhiễm theo chiều ngang mà còn có thể xâm nhiễm theo chiều dọc, tức là buồng trứng là nơi bị nhiễm *Salmonella* và sau đó vi khuẩn này lây nhiễm trực tiếp vào lòng đỏ và lòng trắng trứng (Gantois *et al.*, 2009).



Hình 2. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* tại các vị trí trên trứng gà

Tỷ lệ *Salmonella* phân lập được có chứa gene quy định yếu tố độc lực *Stn*

Từ các mẫu nhiễm *Salmonella* ở vỏ trứng, lòng đỏ và lòng trắng trứng, tiến hành chọn mẫu cho nghiên cứu tiếp theo với nguyên tắc như sau: Các mẫu cho thấy nhiễm *Salmonella* ở cả 3 vị trí (9 mẫu) và mẫu nhiễm vị trí vỏ, lòng đỏ (26 mẫu) thì lấy mẫu nhiễm ở vỏ trứng; Mẫu nhiễm chỉ xuất hiện ở lòng trắng (4 mẫu); Lấy mẫu nhiễm ở lòng đỏ bao gồm: Mẫu nhiễm lòng đỏ (3 mẫu), mẫu nhiễm ở cả lòng đỏ và lòng trắng (1 mẫu). Do vậy, có tổng cộng 43 khuẩn lạc từ 43 mẫu đã được kiểm tra thuộc loài *Salmonella* và sử dụng phương pháp tách DNA, chạy PCR bằng cặp mồi đặc hiệu cho gen *Stn* để thăm dò tỷ lệ *Salmonella* mang yếu tố độc lực *Stn* mã hóa khả năng sinh độc tố đường ruột (Chaudhary *et al.*, 2015). Kết quả cho thấy 43 mẫu kiểm tra đều mang gene chứa độc tố đường ruột. Hình 3 minh họa các sản phẩm khuếch đại cho kích thước 260 bp, tương đồng với kích thước của đoạn gene mã hóa cho độc tố đường ruột *stn*. Gen *Stn* gây độc cho tế bào biểu mô ruột và dẫn đến rối loạn đường ruột. Gen này không chỉ đặc hiệu với *Salmonella* mà còn hiện diện ở tất cả các loài *Salmonella* gây bệnh. Trong nghiên cứu của Chaudhary và đồng tác giả (2015), trong số 37 chủng *Salmonella* phân lập, tất cả các chủng phân lập đều chứa gen độc lực *Stn*. Phương pháp PCR sử dụng để thăm dò gene độc lực có ý nghĩa quan trọng đối với sức khỏe của cộng đồng khi xem xét mức độ phổ biến của các gene độc lực trong các mẫu thực phẩm được nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, các mẫu trứng được phân phối đến tay người tiêu dùng có tỷ lệ nhiễm *Salmonella* cao, và khi thăm dò một trong những yếu tố độc lực là *Stn* thì có thể thấy tất cả chủng *Salmonella* phân lập được đều chứa gene *Stn*.



Hình 3. Kết quả điện di PCR gene *Stn* (260bp) trên gel agarose, lane 1-35: các chủng *Salmonella* từ các vỏ trứng; Lane 36-39 các chủng *Salmonella* từ lòng đỏ trứng; Lane 40-43 Các chủng *Salmonella* từ lòng trắng trứng; Lane M: HyperLadder 50bp, Bioline

Nhìn chung, các đợt bùng phát ngộ độc do vi khuẩn nói chung và bệnh do *Salmonella* nói riêng đều do sự thiếu kiểm soát và mất an toàn vệ sinh thực phẩm trong các bước chăm sóc, vệ sinh, phân phối và vận chuyển từ trang trại đến tay người tiêu dùng. Ở các nước phát triển trên thế giới, các chương trình kiểm soát trong ngành công nghiệp chăn nuôi gia súc, gia cầm đã làm giảm đáng kể bệnh nhiễm khuẩn *Salmonella* liên quan đến trứng. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trên trứng ở những quốc gia này chỉ dưới 2% (Moonsavy *et al.*, 2015; Owen *et al.*, 2016). Trong khi đó, ở các quốc gia đang phát triển như Bangladesh, tỷ lệ nhiễm *Salmonella* thậm chí lên đến 100% trên trứng (Rahman *et al.*, 2019). Kết quả của nghiên cứu này được thực hiện ở các mẫu trứng thu thập được tại địa bàn thành phố Huế cũng cho thấy mức độ nhiễm *Salmonella* trên trứng cao. Thậm chí ở các địa điểm như nông hộ và nhà phân phối thì tỷ lệ nhiễm lên đến 80% và gene *Stn* cũng hiện diện ở tất cả các chủng *Salmonella* phân lập từ mẫu trứng. Theo Biên và Sỹ (2021) cho rằng gen *Stn* có trong các chủng *Salmonella* phân lập từ mẫu thịt gà tươi là 93,33%. Trong khi đó theo Ngân và đồng tác giả (2022) cho rằng gen *Stn* có tỷ lệ 100% ở tất cả các chủng *Salmonella* phân lập ở gà. Như vậy kết quả của chúng tôi cũng tương tự với các công bố trước đây. Điều này dẫn đến khả năng gây ảnh hưởng cao cho sức khỏe của người tiêu dùng khi tiêu thụ trứng cũng như những sản phẩm lên quan đến trứng bị nhiễm *Salmonella*. Vì vậy, chúng tôi khuyến nghị cần áp dụng các chương trình kiểm soát bao gồm: giám sát tại trang trại hoặc hộ gia đình có chăm nuôi gia cầm lấy trứng, tiêu hủy đàn gia cầm

bị nhiễm bệnh, thường xuyên làm sạch và khử trùng chuồng trại, duy trì chuỗi cung ứng trứng với nhiệt độ thấp, làm sạch trứng bằng các biện pháp an toàn trước khi đóng gói và tiêu thụ, tiêm phòng cho đàn gia cầm, tiêu thụ trứng không quá hạn sử dụng (Whitley & Ross, 2015).

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu trên tổng số 60 mẫu trứng gà, tương đương với 180 mẫu từ vỏ trứng, lòng đỏ và lòng trắng trứng, cho thấy sự hiện diện của *Salmonella* trên tất cả các địa điểm lấy mẫu tại thành phố Huế. Cụ thể, tỷ lệ nhiễm *Salmonella* là 58% ở vỏ, 23% ở lòng trắng và 25% ở lòng đỏ trứng. Kết quả chạy điện di trên gel agarose sản phẩm khuếch đại PCR cho thấy tất cả các mẫu *Salmonella* phân lập được đều mang gene *Stx* quy định độc tố đường ruột gây rối loạn đường ruột cho người tiêu thụ trứng bị nhiễm *Salmonella*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al-Wasify RS, El-Taweel GE, Kamel MM, El-Laithy MA (2011). Comparative evaluation of different chromogenic media for detection of *E. coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in water. *International Journal of Academic Research*, 3(3): 6.
- Lê Thế Biên, Trương Xuân Sỹ (2021). Xác định một số gene độc lực trên các serotype salmonella gây bệnh cho người được phân lập từ thịt tươi tại tỉnh Bình Thuận. *Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế Trường Đại học Tây Đô*, Số 11: 252-259.
- Cardoso MJ, Nicolau AI, Borda D, Nielsen L, Maia RL, Møretør T, Ferreira V, Knøchel S, Langsrud S, Teixeira P (2021). *Salmonella* in eggs: From shopping to consumption—A review providing an evidence-based analysis of risk factors. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 20(3): 2716-2741.
- Chaudhary JH, Nayak JB, Brahmabhatt MN, Makwana PP (2015). Virulence genes detection of *Salmonella* serovars isolated from pork and slaughterhouse environment in Ahmedabad, Gujarat. *Vet World*, 8(1): 121.
- El-Saadon MT, Salem HM, El-Tahan AM, Abd El-Mageed TA, Soliman SM, Khafaga AF, Swelum AA, Ahmed AE, Alshammari FA, Abd El-Hack ME (2022). The control of poultry salmonellosis using organic agents: an updated overview. *Poult Sci*, 101(4): 101716.
- Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Van Immerseel F (2009). *FEMS Microbiol Rev*, 33(4): 718-738.
- Trần Thị Xuân Mai, Võ Thị Thanh Phương, Trần Thị Hoàng Yến, Nguyễn Văn Bé (2011). Phát hiện nhanh *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* hiện diện trong thực phẩm bằng kỹ thuật PCR đa môi (multiplex PCR). *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, Số 20b: 198-208.
- Nguyễn Thị Ngân, Phan Thị Hồng Phúc, Phạm Diệu Thùy, Dương Thị Hồng Duyên, Trần Nhật Thắng, Nguyễn Xuân Yên (2022). Nghiên cứu độc lực của các chủng *salmonella* phân lập được từ gà mắc bệnh thương hàn và sử dụng chế phẩm nanosan trong điều trị bệnh cho gà tại huyện Tam Dương, tỉnh Vĩnh Phúc. *TNU Journal of Science and Technology*, Tập 227, Số 1: 159 – 166.
- Moosavy MH, Esmaili S, Amiri FB, Mostafavi E, Salehi TZ (2015). Detection of *Salmonella* spp in commercial eggs in Iran. *Iran J Microbiol*, 7(1): 50.
- Official Journal of the European Union. European Commission Regulation (EC) No. 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *OJEU* 2007, L322, 12–29
- Owen M, Jorgensen F, Willis C, McLauchlin J, Elviss N, Aird H, Fox A, Kaye M, Lane C, de Pinna E (2016). The occurrence of *Salmonella* spp. in duck eggs on sale at retail or from catering in England. *Lett Appl Microbiol*, 63(5): 335-339.
- Quy chuẩn quốc gia QCVN 8-3:2012/BYT về ô nhiễm vi sinh vật trong thực phẩm
- Rahman MA, Ahmad T, Mahmud S, Barman NC, Haque MS, Uddin ME, Ahmed R (2019). Isolation, identification and antibiotic sensitivity pattern of *Salmonella* spp. from locally isolated egg samples. *Am J Pure Appl Sci*, 1(1): 1-11.
- Trần Trọng Kha, Nguyễn Thị Phương Trang (2023). Sử dụng phương pháp loop-mediated isothermal amplification (LAMP) để phát hiện *Salmonella* spp. từ trứng gà. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển*, Tập 22, Số 3: 1-8.
- TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017), Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - Phương pháp phát hiện, định lượng và xác định typ huyết thanh của *Salmonella* - Phần 1: Phát hiện *Salmonella* spp.
- Trần Thanh Vân, Nguyễn Thị Thuý My, Võ Văn Hùng (2019). Ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự nhiễm bẩn vỏ trứng vịt trong điều kiện chăn nuôi tập trung tại tỉnh Hà Tĩnh. *TNU Journal of Science and Technology*, Tập 194, Số 01: 81-86.
- Whitley H, Ross K (2015). *Salmonella* and eggs: from production to plate. *Int J Environ Res Public Health*, 12(3): 2543-2556.

DETERMINATION OF THE PRESENCE OF *SALMONELLA* AND ENTEROTOXIN GENE (*STM*) ISOLATED FROM CHICKEN EGGS

Nguyen Thi Dong Phuong¹, Dang Ngoc Phuong Uyen¹, Ta Dang Y Vi², Huynh Van Chuong^{2*}

¹Department of Food Technology, Faculty of Chemical Engineering – University of Science and Technology, The University of Danang

²Immunology and Vaccine Laboratory - Institute of Biotechnology, Hue University

SUMMARY

Chicken egg has high nutritional and suitable for all ages, however, it belongs to a kind of food that has a risk of causing food poisoning due to the main infectious agent being *Salmonella* spp. In this study, 60 chicken eggs were collected from several locations in the egg supply chain in Hue City to test for the presence of *Salmonella* on eggshells, egg whites, and yolks. The results showed that the average *Salmonella* infection rate in egg shells was 58%, especially, egg samples collected at farmers and distributors showed an infection rate of up to 80%. The infection rates in egg whites and egg yolks are 23% and 25%, respectively. This suggests that *Salmonella* strains can be transmitted from sick hens or the eggshell into the egg white and yolk. In addition, all *Salmonella* strains isolated from egg samples carry *Stn* gene that regulate virulence factors affecting human health.

Keywords: *Salmonella*, chicken egg, *Stn* gene, egg supply chain, virulence factor.

* Author for correspondence: Tel: +84-398951050; Email: hvanchuong@hueuni.edu.vn