

PHÁT HIỆN NHANH *SALMONELLA* SPP. TRONG MẪU THỰC PHẨM BẰNG PCR KẾT HỢP VỚI NUÔI CÂY TRONG MÔI TRƯỜNG CHỌN LỌC

Nguyễn Văn Bé, Võ Thị Thanh Phương, Trang Minh Phương, Trần Thị Xuân Mai

Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xây dựng một quy trình phát hiện nhanh sự hiện diện của vi khuẩn *Salmonella* spp. bằng PCR. Các mẫu kiểm tra được nuôi cấy trong bốn môi trường tăng sinh: (1) Buffer peptone water (BPW), (2) Buffer peptone water và Tetra thionate broth base (BPW+TT), (3) Buffer peptone water và Rapport-Vasiliadis R10 Broth (BPW+RV) và (4) môi trường chọn lọc phối hợp (TT+RV). Hai quy trình trích DNA (phenol-chloroform và trích nhanh bằng xử lý nhiệt) đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Kết quả khảo sát cho thấy khả năng phát hiện *Salmonella* spp. trong môi trường tăng sinh BPW là rất thấp (2%) trong khi trong môi trường BPW+RV cao gấp 3 lần (6%) và trong BPW+TT cao gấp 7 lần (14%). Tuy nhiên môi trường chọn lọc phối hợp (TT+RV) nhạy hơn và chuyên biệt hơn môi trường BPW+RV và BPW+TT, giúp phục hồi sự phát triển của *Salmonella*, nhờ đó khả năng phát hiện vi khuẩn *Salmonella* bằng PCR đạt ở mức 60%. So với quy trình trích DNA bằng phenol-chloroform, độ nhạy của quy trình trích nhanh bằng xử lý nhiệt được đánh giá là 100%. Từ những kết quả đạt được, quy trình này sẽ rất hữu dụng dùng để phát hiện nhanh *Salmonella* spp. hiện diện trong nguồn các thực phẩm tự nhiên.

Từ khóa: Gen *invA*, môi trường chọn lọc, PCR, thực phẩm, *Salmonella* spp

MỞ ĐẦU

Salmonella là một trong những nguồn bệnh nguy hiểm lây truyền qua thức ăn ở nhiều nước trên thế giới. Hàng năm có rất nhiều người nhiễm bệnh này phải nhập viện và những trường hợp bệnh nặng có thể dẫn đến tử vong. Do đó kiểm soát được bệnh lây nhiễm trong thực phẩm là điều rất cần thiết cho các ngành sản xuất thực phẩm. Vi khuẩn *Salmonella* spp. được tìm thấy trong dạ dày và ruột ở phần lớn các động vật, vì vậy tiếp xúc với động vật và các thực phẩm có nguồn gốc động vật thường là nguyên nhân dẫn đến bệnh do vi khuẩn này gây ra (Fratamico, 2003). Gutiérrez *et al.* (2000) đã báo cáo tại Mexico chúng *Salmonella* spp. hiện diện 51% trong các thức ăn nhanh, 23% trong các sản phẩm từ thịt (jambon, xúc xích và thịt xông khói), 22% trong các mẫu thịt (bò, gà, cá), 3% trong các sản phẩm từ sữa và 1% trong các sản phẩm từ trứng. Ở Mỹ có 20% thịt bò, heo, gà tây và gà bị nhiễm *Salmonella* spp. (Talbot *et al.*, 2006). Ở Việt Nam, nhiều mẫu thịt gia súc, gia cầm và trứng bị nhiễm *Salmonella* spp., trong đó 49% mẫu thịt gà ở Hà Nội (Luu *et al.*, 2006); 61% mẫu thịt tươi và gia cầm bán lẻ ở các chợ và siêu thị TP Hồ Chí Minh (Van *et al.*, 2007); 34% mẫu tôm, thịt heo, thịt bò, thịt gà và thịt vịt bán lẻ ở siêu thị và

chợ Đồng bằng sông Cửu Long (Tran *et al.*, 2004).

Một số phương pháp giúp phát hiện *Salmonella* đã được công bố. Phương pháp nuôi cấy truyền thống thường mất nhiều thời gian (5-7 ngày) và rất tốn kém trong khi phương pháp PCR mang lại nhanh chóng và đáng tin cậy để phát hiện sự hiện diện của *Salmonella* trong môi trường tự nhiên. PCR đã và đang được sử dụng thành công để chẩn đoán sự hiện diện của vi khuẩn gây bệnh trong môi trường nước và thực phẩm (Mogani *et al.*, 2007). Tuy nhiên độ nhạy của PCR cũng bị ảnh hưởng rất lớn bởi quy trình nuôi cấy mẫu. Nếu nuôi cấy mẫu trong môi trường không chuyên biệt thì có thể các nguồn vi sinh vật khác chiếm đa số hơn nguồn vi sinh vật mục tiêu và điều này gây ảnh hưởng đến lượng DNA mục tiêu được phân lập quá thấp không đủ để phát hiện. Do đó các môi trường chuyên biệt để nuôi cấy các vi khuẩn mục tiêu là rất cần thiết nhằm giúp tối ưu khả năng phát hiện.

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm tìm ra một quy trình nuôi cấy thích hợp vừa tiết kiệm thời gian vừa nâng cao mật số *Salmonella* vốn dĩ hiện diện rất giới hạn trong thực phẩm đồng thời loại bỏ nguồn vi sinh vật tạp khác để nâng cao hiệu quả phát hiện nhanh chóng sự hiện diện của vi khuẩn này bằng PCR.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu và hóa chất

Sử dụng 50 mẫu thực phẩm bao gồm 6 mẫu chả lụa, 4 mẫu nem chua, 10 mẫu sò huyết, 10 mẫu thịt bò, 10 mẫu thịt gà và 10 mẫu thịt heo từ các chợ tại địa bàn Thành phố Cần Thơ được dùng trong thí nghiệm này.

Taq polymerase, dNTP, BSA được mua từ hãng Fermentas. Thang chuẩn 100 bp (Fermentas) được sử dụng để ước lượng kích thước sản phẩm PCR. Các môi trường nuôi cấy Buffer Peptone Water (BPW), Tetra Thionate Broth Base (TT), Rapport-Vasiladis R10 Broth (RV) được mua từ hãng Difco, USA.

Nuôi cấy tăng sinh

Tăng sinh trong môi trường BPW: 25 g mẫu thực phẩm từ các chợ được cho vào túi nilon vô trùng, thêm 225 ml môi trường không chọn lọc BPW, đồng hóa mẫu bằng máy Stomacher (Laboratory Blender Stomacher 400, Seward Medical, England) trong 30 giây và ủ 24 h ở 37°C.

Tăng sinh trong môi trường chọn lọc BPW+TT hoặc BPW+RV: 25 g mẫu được cho vào túi nilon vô trùng, thêm 225 ml môi trường BPW, ủ 24 h ở 37°C. Một ml dịch nuôi cấy BPW được chủng vào 9 ml môi trường TT hoặc RV tương ứng và nuôi 16-24 h ở 42°C.

Tăng sinh trong môi trường chọn lọc phối hợp TT+RV: 25 g mẫu được cho vào túi nilon vô trùng, thêm 225 ml môi trường BPW ủ 24 h ở 37°C. Một ml dịch nuôi cấy BPW được chủng vào 9 ml môi trường TT và nuôi 16-24 h ở 42°C, sau đó 1 ml dịch nuôi cấy TT được chủng vào 9 ml môi trường RV và nuôi 16-24 h ở 42°C.

Tăng sinh chọn lọc trong 24 h: 25 g mẫu được cho vào túi nilon vô trùng, thêm 225 ml môi trường BPW. Sau khi ủ 5 h ở 37°C, 1 ml dịch nuôi cấy BPW được chuyển vào 9 ml môi trường TT và nuôi 4 h ở 42°C. Sau đó, 1 ml dịch nuôi cấy TT được chuyển vào 9 ml môi trường RV, nuôi 15 h ở 42°C.

Các mẫu sau khi được nuôi trong những môi trường và điều kiện khác nhau để tăng sinh khối vì sinh vật được trích DNA để kiểm tra sự hiện diện của *Salmonella* bằng PCR.

Thiết kế mỗi PCR từ vi khuẩn *Salmonella*

Hai đoạn mỗi cho *Salmonella enterica* được

thiết kế theo trình tự gen *invA* (GenBank: M90846) bằng phần mềm DNAMAN có trình tự: InvAF 5'-TGG CAT TAT CGA TCA GTA CCA G-3' và InvAR 5'-AAC AGC TGC GTC ATG ATA TTC C-3'. Sử dụng cặp mỗi này, sản phẩm PCR được khuếch đại là 600 bp.

Trích DNA bằng phenol-chloroform

Phương pháp trích này dựa theo quy trình của Wilson et al. (1992) nhưng có một vài thay đổi. Vi khuẩn được ly tâm 10 phút với 13000 rpm. Tủa được hòa tan với 1 ml 1x TE ly tâm 5 phút với 13000 rpm. Tủa lại được hòa tan với 350 µl 1x TE, thêm 30 µl lysozyme (50 mg/ml), lắc đều rồi đặt 30 phút trên nước đá. Hỗn hợp được bổ sung 40 µl 10% SDS, lắc đều, thêm 40 µl proteinase K (10 mg/ml), đảo đều, ủ 2-3 h ở nhiệt độ phòng. Sau đó hỗn hợp được bổ sung 800 µl phenol (pH 7), lắc đều, ly tâm 10 phút với 13000 rpm. Dịch phía trên được hút vào ống có sẵn 150 µl TE, bổ sung một lượng tương đương phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1), lắc đều, ly tâm 1 phút với 13000 rpm. Phần trong phía trên được chuyển sang ống mới chứa 75 µl sodium acetate (3M, pH 7,2), lắc đều. Bổ sung 1 ml ethanol 96%, đặt trong nước đá 10 phút. Sau khi ly tâm 15 phút với 13000 rpm, tủa được rửa với ethanol 70%, ly tâm 5 phút với 13000 rpm. Tủa DNA được làm khô và hòa tan vào 30 µl nước cất.

Trích nhanh DNA bằng xử lý nhiệt

Phương pháp này cơ bản dựa theo quy trình của Santos et al. (2001) nhưng có một vài thay đổi như sau: 2 ml dịch vi khuẩn được ly tâm 5 phút với 13000 rpm. Tủa tế bào được hòa tan với 1 ml 1x TE, lắc rung đều 10 giây. Sau khi ly tâm 3 phút với 13000 rpm, tủa được lặp lại lần hai, thêm 100 µl 1x TE, trộn đều trong 10 giây. Sau khi ủ 10 phút ở 95°C, dịch DNA được ly tâm 5 phút với 13000 rpm và giữ lại dịch nổi chứa DNA.

PCR

Hỗn hợp PCR bao gồm 50-100 ng DNA, 2,5 µl đệm 10x (100 mM Tris, 500 mM KCl, pH 9, 1% (v/v) Triton X-100), 3 µl 25 mM MgCl₂, 4 µl 0,2 mM dNTP, 0,4 µM mỗi mỗi, 0,25 µl Taq DNA polymerase (5 U/µl), 0,25 µl 0,1% BSA, thêm nước cất vô trùng cho đủ thể tích 25 µl. Phản ứng khuếch đại được thực hiện ở 95°C/5'; 35x (95°C/30", 60°C/30", 72°C/1'); 72°C/10'. Sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di gel 1,5% agarose trong đệm 1x TBE và chụp bằng máy chụp hình gel Biorad UV 2000.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng phát hiện *Salmonella* trong các môi trường nuôi cấy tăng sinh bằng PCR

Môi trường tăng sinh là một trong những điều kiện tiên quyết giúp phục hồi và nhân nhanh các dòng *Salmonella*. Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã sử dụng 50 mẫu thực phẩm để nuôi cấy trong bốn môi trường tăng sinh BPW, BPW+TT, BPW+RV và TT+RV. Tỷ lệ phát hiện *Salmonella* spp. bằng PCR với môi trường tăng sinh BPW là rất thấp, chỉ có 1/50 mẫu cho sản phẩm PCR (600 bp), chiếm 2% (bảng 1). Đối với quy trình tăng sinh trên môi trường chọn lọc BPW+RV, thì khả năng phát hiện sự hiện diện *Salmonella* là 3/50 chiếm tỷ lệ 6%. Ở môi trường chọn lọc BPW+TT, khả năng phát hiện sự hiện diện *Salmonella* đã được cải thiện hơn, có 7/50 mẫu có xuất hiện băng DNA 600 bp, chiếm tỷ lệ 14%. Trong khi đó với quy trình tăng sinh chọn lọc

phối hợp TT+RV thì có đến 30/50 mẫu cho sản phẩm khuếch đại 600 bp, chiếm tỷ lệ 60%.

Carli và đồng tác giả (2001) đã sử dụng PCR để kiểm tra sự hiện diện của *Salmonella* trong các mẫu lấy nhiễm nhân tạo và được nuôi cấy trên các loại môi trường tiên tăng sinh khác nhau như BPW, NB (nutrient broth) và TT thì chỉ những mẫu được nuôi cấy trên môi trường TT mới cho kết quả PCR dương tính. Trong khi đó Oliveria *et al.* (2002) đã xác nhận rằng tính chuyên biệt và độ nhạy của PCR khi kết hợp nuôi cấy các mẫu thực phẩm trong môi trường chọn lọc RV cao hơn trong các môi trường không chọn lọc (BPW). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy khả năng nhận diện các dòng *Salmonella* khi nuôi cấy mẫu trên môi trường không chọn lọc BPW rất thấp so với môi trường chuyên biệt BPW+RV hoặc BPW+TT. Đặc biệt nếu kết hợp cả hai môi trường TT và RV thì khả năng phát hiện tăng lên rất đáng kể.

Bảng 1. Tỷ lệ mẫu nuôi cấy trong các môi trường tăng sinh khác nhau dương tính với PCR sử dụng cặp mồi *invA*

Thực phẩm	Số mẫu (n)	Số mẫu dương tính với PCR trong các môi trường			
		BPW	TT	RV	TT+RV
Chả lụa	6	0	0	0	2
Nem chua	4	0	0	0	2
Sò huyết	10	0	3	1	8
Thịt bò	10	0	2	1	5
Thịt gà	10	1	2	1	7
Thịt heo	10	0	0	0	6
Tổng cộng	50	2%	14%	6%	60%

Cải thiện quy trình nuôi cấy *Salmonella* trong 24 h

Mặc dù quy trình nuôi cấy tăng sinh *Salmonella* trong môi trường TT+RV đã chứng tỏ rất hiệu quả, nhưng phải mất 60 - 72 h nuôi cấy, điều này không mang tính khả thi để phát hiện nhanh sự hiện diện của *Salmonella*. Để khắc phục nhược điểm này một quy trình nuôi cấy rút ngắn thời gian chỉ còn 24 h đã được thực hiện. Trong thí nghiệm này, 15 mẫu thực phẩm đã được xác nhận bị nhiễm *Salmonella* bằng nuôi cấy tăng sinh TT+RV trong 72 h nhằm so sánh hiệu quả phát hiện qua quy trình nuôi cấy tăng sinh TT+RV trong 24 h. Khả năng phát hiện *Salmonella* bằng quy trình nuôi cấy tăng sinh trong 24 h hoàn toàn giống với quy trình nuôi cấy 72 h (Hình 1).

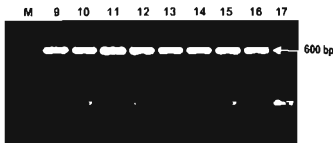
Để tăng sinh khối *Salmonella* có trong thực phẩm, phần lớn các nhà nghiên cứu thường dùng môi trường tiên tăng sinh không chọn lọc BPW trong giai đoạn đầu, thời gian nuôi cấy có thể từ 6 - 24 h. Sau giai đoạn tiên tăng sinh để hạn chế tối đa sự phát triển các nguồn vi sinh vật không phải *Salmonella* các loại môi trường chuyên biệt như TT hoặc RV thường được khuyến khích sử dụng. Moganedi và đồng tác giả (2007) đã nuôi cấy mẫu trong môi trường BPW trong 6 h ở 36°C sau đó chủng vào môi trường RV theo tỷ lệ 1:10 hoặc 1:100 dung dịch nuôi cấy BPW tùy theo nồng độ nuôi cấy ít hay nhiều và ủ 24 h ở 43°C. Wang và đồng tác giả (2009) đã nuôi cấy mẫu thực phẩm trong môi trường tiên tăng sinh BPW trong 8 h sau đó chủng 1 ml dịch nuôi cấy này vào môi trường SCB (selenite cystine broth) ủ 8-12 h ở 37°C. Theo

nghiên cứu của Fratamico (2003), hiệu quả phát hiện *Salmonella* tăng cao khi các mẫu được nuôi cấy trong môi trường tiên tăng sinh BPW trong 24 h ở 37°C sau đó chủng 0,5 ml dịch nuôi cấy này

vào 9,5 ml môi trường chọn lọc RV ù 20 h ở 42°C. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi theo quy trình nuôi cấy 24 h (BPW 5 h, TT 4 h và RV trong 15 h) chứng tỏ hoàn toàn rất hiệu quả.



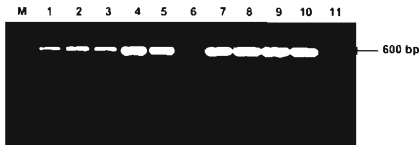
Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR từ các mẫu thực phẩm nuôi tăng sinh trong môi trường TT+RV trong 24 h. Giếng 1-2: Thịt bò, 3-4: Thịt heo, 5-7: Thịt gà; 8 và 17: Nước, 9-11: Vò trứng gà; 12-14: Nêm chua, 15-16: Sô huyết, M: Thang chuẩn 100 bp (Fermentas)



Cải thiện quy trình trích DNA

Các mẫu DNA được trích bằng quy trình phenol-chloroform cho kết quả PCR dương tính cao. Tuy nhiên quy trình này mất từ 6-8 h và sử dụng nhiều loại hóa chất. Quy trình trích nhanh DNA bằng xử lý nhiệt trong 30 phút cho thấy chất lượng DNA vẫn đạt tiêu chuẩn để sử dụng trong phân tích PCR. So sánh với DNA được trích theo quy trình phenol-chloroform cho thấy tỷ lệ phát

hiện *Salmonella* đạt 100% (Hình 2). Theo nghiên cứu của Santos (2001) khi sử dụng quy trình trích nhanh bằng xử lý nhiệt để phát hiện *Salmonella* trong các mẫu thịt gà gây nhiễm nhân tạo đã không khuếch đại được gen mục tiêu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng dựa trên quy trình trích nhanh của Santos nhưng có một vài thay đổi đã cải thiện chất lượng DNA hoàn toàn đủ tiêu chuẩn để phân tích bằng PCR.



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm PCR với khuôn DNA của các mẫu thực phẩm nhiễm *Salmonella* trích bằng phenol-chloroform (1-5) và xử lý nhiệt (7-11), Nước (6); Thang chuẩn 100 bp (Fermentas) (M).

KẾT LUẬN

Môi trường chọn lọc phối hợp TT+RV đã chứng tỏ rất chuyên biệt và giúp phục hồi nhanh *Salmonella* spp.

Rút ngắn thời gian nuôi cấy các mẫu vật cần kiểm nghiệm trong môi trường chọn lọc phối hợp TT+RV từ 72 h xuống còn 24 h vừa đảm bảo

tính chính xác vừa tiết kiệm thời gian rất nhiều.

Quy trình trích nhanh DNA bằng xử lý nhiệt rất đơn giản nhưng hiệu quả vẫn cao góp phần tối ưu các điều kiện giúp phát hiện nhanh *Salmonella* spp.

Lời cảm ơn: Tập thể các tác giả xin chân thành cảm ơn Đại học Cần Thơ đã cấp kinh phí cho công trình nghiên cứu này

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Carli KT, Unal CB, Caner V, and Eynor A (2001) Detection of salmonellae in chicken feces by a combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR, and capillary gel electrophoresis *J Clin Microbiol* 39: 1871-1876.

Fraticco (2003) Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* assays for detection of *Salmonella* spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef *Mol Cell Probes* 17: 215-221.

Gutiérrez CL, Montiel VE, Aguilem PP, González AMC (2000) Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México *Salud Pública de México* 42: 490-495

Liu QH, Fries R, Padungtod P, Hanh TT, Kyule M, Baumann MPO, Zessin KH (2006) Prevalence of *Salmonella* in retail chicken meat in Hanoi, Vietnam. *Am NY Acad Sci* 1081: 257-261.

Mogamedi KLM, Goyvaerts EMA, Venter SN, Sibara MM (2007) Optimization of the PCR-*invA* primers for the detection of *Salmonella* in drinking and surface waters following pre-cultivation step. *Water SA* 33: 196-202.

Oliveira SD, Santos LRD, Schuch MT, Silva ABC, Sallé TP, Canal CW (2002) Detection and identification of

Salmonellas from poultry-related samples by PCR *Vet Microbiol* 87: 25-35.

Santos LR, Nascimento VP, Oliveira SD, Flores ML, Pontes AP, Ribeiro AR, Sallé CTP, Lopes RFF (2001) Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 43: 247-250.

Tran TP, Ly TL, Nguyen TT, Akiba M, Ogasawara N (2004) Prevalence of *Salmonella* spp. in pigs, chickens and ducks in the Mekong Delta, Vietnam. *J Vet Med Sci* 66:1011-1014.

Talbot AE, Gagnon ER, Greenblatt J (2006) Common ground for the control of multidrug resistant *Salmonella* in ground beef. *Clin Infect Dis* 42: 1455-1462.

Van TTII, Moutafis G, Istivan T, Tran LT, Coloe PJ (2007) Detection of *Salmonella* spp. in retail raw food samples from Vietnam and characterization of their antibiotic resistance. *Appl Environ Microbiol* 73(21): 6885-6890

Wang SJ, Yeh DB, Wei CI (2009) Specific PCR primers for the identification of *Salmonella enteritica* Serovar Enteritidis in chicken-related samples. *J Food Drug Anal* 17: 183-189

Wilson MA, Rimpler RB, Hofman LJ (1992) Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup B and E *Pasteurella multocida* *J Clin Microbiol* 30: 1518-1524.

RAPID DETECTION OF *SALMONELLA* SPP. IN FOOD SAMPLES BY PCR IN COMBINATION WITH SELECTIVE CULTURE MEDIA

Nguyen Van Be, Vo Thi Thanh Phuong, Trang Minh Phuong, Tran Thi Xuan Mai*

Cantho University

SUMMARY

The aim of this study was to develop a polymerase chain reaction (PCR) procedure for detection of *Salmonella* spp. in food samples. A total of 50 specimens of meat and marine products were pre-enriched in four different media: (1) Buffer peptone water (BPW), (2) BPW and Tetra thionate broth base (BPW+TT), (3) BPW and Rappor-Vasiladis R10 Broth (BPW+RV), and (4) Combination of selective media (TT+RV). Two DNA extraction protocols (phenol-chloroform and thermal treatment) were used in this study. The results showed that the efficiency for detection of *Salmonella* spp. in BPW medium was very low (2%), whereas that in BPW+RV and BPW+TT medium was higher (6% and 14%), respectively. However, in the combination of two selective media (TT+RV) it was indicated that more sensitive and specific for recovering *Salmonella* than in the medium of BPW+RV and BPW+TT, therefore PCR was able to detect at 60%. Compared to DNA extraction protocol by phenol-chloroform method, the sensitivity of thermal treatment method was estimated at 100%. As the results are obtained, this procedure will be useful for detection of *Salmonella* spp. in food products.

Keywords: Food products, *invA* gene, PCR, *Salmonella* spp., selective medium

* Author for correspondence: E-mail: txmai@ctu.edu.vn