

# BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT SỰ NHIỄM *LISTERIA MONOCYTOGENES* TRONG MỘT SỐ THỰC PHẨM TRÊN THỊ TRƯỜNG HÀ NỘI BẰNG KỸ THUẬT POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

NGUYỄN MINH THỰC, TRẦN MẠNH HÙNG, TRỊNH THU LÊ, TÔ KIM ANH

## 1. MỞ ĐẦU

*Listeria monocytogenes* có mặt trong thực phẩm là một trong 400 tác nhân gây bệnh từ thực phẩm cho người. Nhiễm *L.monocytogenes* ở nồng độ 100 CFU có thể gây bệnh listeriosis với một phổ rất rộng các triệu chứng: viêm màng não, nhiễm trùng máu, sảy thai, và viêm ruột ở người và động vật, đặc biệt nguy hiểm với người bị suy giảm miễn dịch [1-3]. Việc phát hiện sự có mặt của *L.monocytogenes* theo phương pháp tiêu chuẩn 52 TCN – TQTP 0002: 2003 gặp nhiều khó khăn do tính phức tạp của phương pháp, và đặc biệt khó thực hiện khi cần phân tích sàng lọc một số lượng lớn mẫu. Nhiều kỹ thuật hiện đại gần đây đã được phát triển và áp dụng để phát hiện nhanh *L.monocytogenes* với thao tác đơn giản hơn, độ chính xác cao và thời gian phân tích ngắn hơn, trong đó, phương pháp dựa trên kỹ thuật PCR là được coi là thích hợp để phân tích sàng lọc mẫu trong phòng thí nghiệm [4-7]. Để áp dụng kỹ thuật PCR trong phân tích, (các) cặp mồi cần được thiết kế đặc hiệu đối với *L.monocytogenes* và quy trình phân tích cần được xem xét tới đặc trưng của thực phẩm cần phân tích.

Phương pháp phân tích *L. monocytogenes* với cặp mồi LM-F76 và LM-R543 đặc hiệu với gen độc *listeriolysin O (hlyA)* đã được thiết kế và thử nghiệm đặc hiệu với *L. monocytogenes* [8] và được phát triển cho từng loại sản phẩm thực phẩm [9-11], cho phép phân tích một lượng mẫu lớn với độ chính xác cao. Bài báo đề cập kết quả sử dụng quy trình phân tích dựa trên kỹ thuật PCR áp dụng cho phân tích một số sản phẩm thịt, sữa [10, 11] để bước đầu khảo sát mức độ nhiễm loài vi khuẩn nguy hiểm này trong một số sản phẩm có nguy cơ cao thuộc nhóm này.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Mẫu thực phẩm

Mẫu thực phẩm sử dụng trong nghiên cứu bao gồm một số sản phẩm có nguồn gốc từ thịt, sữa được lấy tại các nhà máy hoặc mua tại các cửa hàng thực phẩm và siêu thị trên thành phố Hà Nội trong khoảng thời gian từ 2/2006 – 2/2007.

### 2.2. Môi trường

Môi trường LEB, Difco (*Listeria* Enrichment Broth) được sử dụng cho tăng sinh vi khuẩn. Môi trường Oxford, Sigma sử dụng để kiểm tra phương pháp. Dung dịch pha loãng mẫu là nước muối sinh lý 0,9% NaCl.

### 2.3. Hóa chất

Hóa chất cho điện di trên gel agarose, thang ADN chuẩn do Sigma cung cấp. Hóa chất sử dụng cho phản ứng PCR do Amersham Pharmacia Biotech cung cấp. Các hóa chất khác có độ tinh sạch phân tích. Cặp mồi LM-F76, LM-R543 [8] và cặp mồi 16S/F rRNA [12] do Invitrogen cung cấp.

### 2.4. Phương pháp lấy mẫu

Mẫu được lấy ngẫu nhiên theo mẻ sản xuất, theo lô sản phẩm tại cơ sở sản xuất hoặc mua tại cửa hàng, siêu thị.

Mẫu sữa sử dụng trong nghiên cứu gồm sữa nguyên liệu, sữa thanh trùng, bơ, sữa bán thành phẩm, sữa thu hồi lấy tại nhà máy. Mẫu sữa thí nghiệm được lấy theo quy trình lấy mẫu tại nhà máy có áp dụng hệ thống kiểm tra và đảm bảo chất lượng HACCP. Ngoài ra, các mẫu sữa thanh trùng và tiệt trùng có hoặc không có bao gói trên thị trường cũng được kiểm tra. Mẫu sản phẩm thịt là sản phẩm chế biến, đã qua xử lý nhiệt hoặc không (xúc xích, nem chua), bán trên thị trường. Mẫu đã lấy được bảo quản ở 4°C cho tới khi phân tích. Các mẫu được lấy và phân tích trong thời hạn sử dụng của nhà sản xuất, mẫu không bao gói được phân tích ngay sau khi lấy mẫu.

### 2.5. Phương pháp chuẩn bị mẫu

Bao bì mẫu được khử trùng bằng EtOH 70°. Dụng cụ cắt mẫu đã được khử trùng cắt bao bì, cắt và cân trong điều kiện vô trùng 25g mẫu cho một lần phân tích. Mẫu đã lấy được chứa vào túi chuyên dụng chứa 225 ml môi trường LEB đã tiệt trùng để tiến hành đồng hóa mẫu trên thiết bị đập mẫu Stomacher 400.

### 2.6. Phân tích phát hiện *L. monocytogenes* bằng PCR

Việc phân tích phát hiện sự có mặt của *L. monocytogenes* trong các mẫu thực phẩm được thực hiện theo các quy trình tương ứng cho các sản phẩm thịt và sữa đã được xây dựng trong các nghiên cứu trước [10, 11]. Các bước thực hiện bao gồm:

- Tăng sinh: 25 g mẫu được nghiền (hoặc trộn) trong 225 ml môi trường LEB, được đem tăng sinh trong thiết bị lắc ổn nhiệt ở 37°C tốc độ lắc 200 vòng/phút trong thời gian tương ứng 20 - 24 giờ.

- Phản ứng PCR và xử lý kết quả: Tiến hành thu nhận DNA từ các mẫu tăng sinh theo phương pháp đã trình bày trong các tài liệu trước [10,11] làm khuôn cho phản ứng PCR. Phản ứng PCR được thực hiện với thể tích 25  $\mu$ l với chu trình nhiệt gồm 94°C trong 3 phút, (94°C 30 giây, 60°C 30 giây, 72°C 1 phút)  $\times$  35 chu kì, 72°C 5 phút và ổn định sản phẩm ở 10°C. Kết quả của phản ứng PCR được đánh giá bằng điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5%.

- Phương pháp điện di DNA: 5  $\mu$ l sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di DNA trên gel agarose 1,5%. Dòng điện sử dụng cho điện di là 100 mA. Sau khi điện di, DNA được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide và soi dưới bước sóng 254 nm.

- Đánh giá kết quả: các mẫu xuất hiện các băng DNA tương ứng với vị trí 468 bp trong các phản ứng PCR với cặp mồi LM-F76, LM-R543 là các mẫu bị nhiễm *L. monocytogenes*.

### 2.7. Phân tích khẳng định kết quả

Các mẫu tăng sinh cho kết quả PCR dương tính được quét trên môi trường Oxoford. DNA từ các khuẩn lạc đen được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi 16 S/F. Sản phẩm PCR với cặp mồi 16 S/F được tinh sạch với kit Htinh sạch DNA do Invitrogen cung cấp. Sản phẩm PCR với đoạn gen 16 S rDNA được gửi xác định trình tự và so sánh mức tương đồng với các trình tự 16 S rDNA đã công bố trên ngân hàng gen.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Các mẫu phân tích

*Bảng 1. Các mẫu sản phẩm thịt dùng cho phân tích*

| TT  | Loại mẫu           | Kí hiệu mẫu | Ngày lấy mẫu | TT  | Loại mẫu              | Kí hiệu mẫu | Ngày lấy mẫu |
|-----|--------------------|-------------|--------------|-----|-----------------------|-------------|--------------|
| 1.  | Xúc xích nướng     | M1-10       | 16.05.06     | 2.  | Xúc xích xông khói    | M2-15       | 13.05.06     |
| 3.  | Xúc xích nướng     | M1-1        | 11.04.06     | 4.  | Xúc xích xông khói    | M2-17       | 20.05.06     |
| 5.  | Xúc xích xông khói | M2-1        | 11.04.06     | 6.  | Xúc xích nướng        | M1-11       | 22.05.06     |
| 7.  | Xúc xích xông khói | M1-2        | 12.04.06     | 8.  | Mẫu xúc xích nướng    | A11         | 20.11.06     |
| 9.  | Xúc xích nướng     | M1-3        | 12.04.06     | 10. | Mẫu xúc xích nướng    | A12         | 20.11.06     |
| 11. | Xúc xích xông khói | M2-2        | 13.04.06     | 12. | Mẫu xúc xích nướng    | A13         | 01.12.06     |
| 13. | Xúc xích xông khói | M2-3        | 14.04.06     | 14. | Mẫu xúc xích nướng    | A14         | 15.12.06     |
| 15. | Xúc xích nướng     | M1-4        | 14.04.06     | 16. | Mẫu xúc xích nướng    | A15         | 20.01.07     |
| 17. | Xúc xích xông khói | M2-4        | 15.04.06     | 18. | Mẫu xúc xích hun khói | A21         | 25.01.07     |
| 19. | Xúc xích nướng     | M1-5        | 17.04.06     | 20. | Mẫu xúc xích hun khói | A21         | 29.01.07     |
| 21. | Xúc xích xông khói | M2-5        | 17.04.06     | 22. | Mẫu xúc xích hun khói | A21         | 29.01.07     |
| 23. | Xúc xích xông khói | M2-6        | 18.04.06     | 24. | Mẫu xúc xích hun khói | A31         | 01.02.07     |
| 25. | Xúc xích nướng     | M1-6        | 18.04.06     | 26. | Mẫu xúc xích hun khói | A32         | 01.02.07     |
| 27. | Xúc xích xông khói | M2-7        | 20.04.06     | 28. | Mẫu xúc xích nướng    | B11         | 01.12.06     |
| 29. | Xúc xích xông khói | M2-8        | 22.04.06     | 30. | Mẫu xúc xích nướng    | B12         | 05.12.06     |
| 31. | Xúc xích nướng     | M1-7        | 23.04.06     | 32. | Mẫu xúc xích nướng    | B13         | 15.12.06     |
| 33. | Xúc xích xông khói | M2-9        | 24.04.06     | 34. | Mẫu xúc xích nướng    | B14         | 15.12.06     |
| 35. | Xúc xích xông khói | M2-10       | 25.04.06     | 36. | Mẫu xúc xích nướng    | B15         | 20.01.07     |
| 37. | Xúc xích nướng     | M1-8        | 26.04.06     | 38. | Mẫu xúc xích hun khói | B21         | 25. 01.07    |
| 39. | Xúc xích xông khói | M2-11       | 27.04.06     | 40. | Mẫu xúc xích hun khói | B22         | 29.01.07     |
| 41. | Xúc xích xông khói | M2-12       | 28.04.06     | 42. | Mẫu xúc xích hun khói | B23         | 30.01.07     |
| 43. | Xúc xích xông khói | M2-13       | 02.05.06     | 44. | Mẫu xúc xích hun khói | B24         | 01.02.07     |
| 45. | Xúc xích xông khói | M2-14       | 13.03.06     | 46. | Mẫu nem chua          | C11         | 30.01.07     |
| 47. | Xúc xích nướng     | M1-9        | 12.05.06     | 48. | Mẫu nem chua          | C12         | 01.02.07     |

Bảng 2. Các mẫu sữa và sản phẩm sữa dùng cho phân tích

| Loại mẫu                 | Mô tả mẫu                        | Ngày lấy mẫu | Loại mẫu                                 | Mô tả mẫu                          | Ngày lấy mẫu |
|--------------------------|----------------------------------|--------------|------------------------------------------|------------------------------------|--------------|
| Sữa tươi nguyên liệu     | Hộ 1                             | 02.04.06     | Sữa tươi nguyên liệu                     | Quảng Ninh                         | 03.03.06     |
|                          | Hộ 3                             | 02.04.06     |                                          | Hộ 1                               | 02.03.06     |
|                          | Hộ 4                             | 02.04.06     |                                          | Hộ 1                               | 03.03.06     |
|                          | Trại 1                           | 03.04.06     |                                          | Hộ 7                               | 03.03.06     |
|                          | Hộ 3                             | 05.04.06     |                                          | Hộ 5                               | 03.03.06     |
|                          | Hộ 5                             | 04.04.06     |                                          | Hộ 1                               | 07.03.06     |
|                          | Hộ 6                             | 12.04.06     |                                          | Hộ 5                               | 07.03.06     |
|                          | Bắc Ninh                         | 06.04.06     |                                          | Hộ 8                               | 07.03.06     |
|                          | Hộ 2                             | 10.04.06     |                                          | Trại 1                             | 07.03.06     |
|                          | Hộ 1                             | 10.04.06     |                                          | Hộ 6                               | 07.03.06     |
|                          | Hộ 6                             | 13.04.06     |                                          | Hộ 9                               | 07.03.06     |
|                          | Trại 1                           | 17.04.06     |                                          | Ba Vì                              | 07.03.06     |
|                          | Quảng Ninh                       | 17.04.06     |                                          | Hộ 2                               | 09.03.06     |
|                          | Hộ 1                             | 17.04.06     | Bán thành phẩm và bán thành phẩm thu hồi | Mẻ 3                               | 03.03.06     |
|                          | Trại 1                           | 24.03.06     |                                          | Chua dâu                           | 03.03.06     |
|                          | Trại 1                           | 28.03.06     |                                          | chua uống                          | 03.03.06     |
|                          | Hộ 5                             | 24.03.06     |                                          | tươi dâu                           | 03.03.06     |
|                          | Hộ 3                             | 23.03.06     |                                          | chua dâu 2                         | 03.03.06     |
|                          | Hộ 5                             | 28.03.06     |                                          | dưa 3                              | 03.03.06     |
|                          | Hộ 4                             | 24.03.06     |                                          | tươi hoa quả                       | 03.03.06     |
|                          | Bắc Ninh                         | 02.03.06     |                                          | dâu thu hồi                        | 06.03.06     |
|                          | Ba Vì                            | 24.03.06     |                                          | Hoa quả thu hồi                    | 08.03.06     |
|                          | dâu thu hồi                      | 08.03.06     | Sữa bột                                  | Sữa bột mẻ chua hoa quả            | 03.03.06     |
| Thành phẩm trong nhà máy | Socola hộp                       | 05.03.06     |                                          | Sữa bột mẻ tươi dâu                | 04.04.06     |
|                          | Socola túi                       | 9h00         | Bơ                                       | Bơ mẻ 3                            | 05.03.06     |
|                          | chua dâu uống                    | 9h00         |                                          | Bơ mẻ 3                            | 07.03.06     |
|                          | sữa hoa quả                      | 9h00         |                                          | Bơ mẻ 2                            | 08.03.06     |
|                          | sữa dâu                          | 9h00         |                                          | Bơ loãng                           | 04.03.06     |
| Sữa bột                  | Sữa bột                          | 02.03.06     |                                          | Bơ đặc 1                           | 06.03.06     |
|                          | Sữa bột                          | 03.03.06     |                                          | Bơ đặc 2                           | 07.04.06     |
| Sữa bán trên thị trường  | Sữa túi thanh trùng, có đường    | 19 mẫu       | Sữa bán trên thị trường                  | Sữa hộp 1 lít thanh trùng          | 10 mẫu       |
|                          | Sữa túi thanh trùng, không đường | 17 mẫu       |                                          | Sữa lít thanh trùng, không bao gói | 11 mẫu       |

Với khả năng phát triển dễ dàng của *L.monocytogenes* trong điều kiện khắc nghiệt như môi trường muối, nhiệt độ lạnh, các thực phẩm gia nhiệt không đầy đủ và bảo quản lạnh dài ngày là các thực phẩm có nguy cơ nhiễm *L.monocytogenes*. Các mẫu thực phẩm được lựa chọn để khảo sát khả năng nhiễm *L.monocytogenes* trong nghiên cứu này là các thực phẩm có nguồn gốc sữa và thịt, bao gồm 49 sản phẩm thịt (xúc xích, nem chua), 116 mẫu sản phẩm sữa (sữa tươi nguyên liệu, sữa bán thành phẩm, sữa thu hồi trong nhà máy, sữa thanh trùng, tiệt trùng bán trên thị trường) (bảng 1, 2). Các mẫu được phân tích ngay sau khi mua, hoặc bảo quản như điều kiện quy định của sản phẩm. Mọi phân tích mẫu đều được thực hiện trong hạn sử dụng của mẫu.

**3.2. Kết quả phân tích *L.monocytogenes* bằng PCR với cặp mồi LM-F76, LM-R543 đặc hiệu cho gen *hlyA***

Các mẫu được tăng sinh như trình bày trong phần phương pháp. 3 µl dung dịch DNA được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi LM-F76, LM-R543 đặc hiệu. Kết quả phân tích các mẫu được trình bày trong hình 1, bảng 3.

*Bảng 3. Các mẫu dương tính với LM-F76, LM-R543*

| STT | Loại mẫu              | Kí hiệu mẫu | Ngày lấy mẫu |
|-----|-----------------------|-------------|--------------|
| 1.  | Xúc xích xông khói    | M1-2        | 12.04.06     |
| 2.  | Xúc xích nướng        | M1-6        | 18.04.06     |
| 3.  | Xúc xích xông khói    | M2-12       | 28.04.06     |
| 4.  | Xúc xích xông khói    | M2-14       | 13.03.06     |
| 5.  | Mẫu xúc xích nướng    | A11         | 20.11.06     |
| 6.  | Mẫu xúc xích nướng    | B11         | 01.12.06     |
| 7.  | Mẫu xúc xích nướng    | B13         | 15.12.06     |
| 8.  | Mẫu xúc xích hun khói | B23         | 30.01.07     |
| 9.  | Mẫu xúc xích hun khói | A31         | 01.02.07     |
| 10. | Mẫu xúc xích hun khói | A32         | 01.02.07     |
| 11. | Mẫu nem chua          | C12         | 01.02.07     |

Do ngưỡng phát hiện của phương pháp là 10 CFU/25g, ml sản phẩm [10, 11], như vậy, các sản phẩm sữa phân tích không nhiễm hoặc nhiễm *L.monocytogene* dưới mức phân tích, trong khi đó, các mẫu thịt khảo sát có 11/49 mẫu nhiễm *L.monocytogenes* ở mức phát hiện của phương pháp.

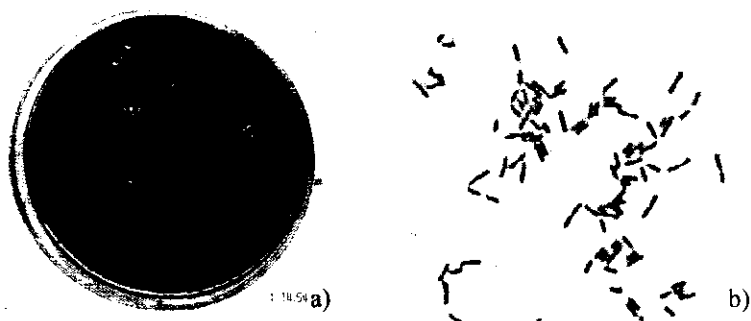
Theo các cảnh báo trên thế giới, sữa tươi nguyên liệu và sữa tươi thanh trùng có nguy cơ nhiễm *L. monocytogenes* cao. Kết quả phân tích cho thấy các mẫu sữa phân tích ngay cả sữa tươi nguyên liệu đều không nhiễm *L. monocytogenes*. Điều này cho thấy điều kiện thu nhận sữa tươi hiện đang được đảm bảo. Sản lượng sữa tươi thấp trong sữa sản phẩm cũng là một đặc điểm đảm bảo vệ sinh của chất lượng sữa sản phẩm. Ngược lại, các sản phẩm thịt đã lựa chọn để phân tích: xúc xích, nem chua đều có mức nhiễm *L. monocytogenes* khá cao, 11/49 mẫu. Mặc dù mới chỉ là kết quả khảo sát bước đầu khả năng nhiễm vi khuẩn này trong thực phẩm nhưng kết quả phân tích cũng cho thấy rõ, các sản phẩm không được gia nhiệt đầy đủ và được bảo quản lạnh

dài ngày là các thực phẩm thực sự có nguy cơ nhiễm *L. monocytogenes*. Tuy vậy, do số lượng mẫu được khảo sát chưa nhiều, các số liệu công bố ở đây chỉ có tác dụng cảnh báo tình trạng thiếu an toàn của một số thực phẩm trên thị trường.



Hình 1. Kết quả PCR của các mẫu dương tính với đoạn gen *hlyA*

|              |              |             |
|--------------|--------------|-------------|
| Ladder 1kb   | 4. Mẫu M2-14 | 8. Mẫu B 23 |
| 1. Mẫu M1-2  | 5. Mẫu A11   | 9. Mẫu A31  |
| 2. Mẫu M1-6  | 6. Mẫu B11   | 10. Mẫu A32 |
| 3. Mẫu M2-12 | 7. Mẫu B13   | 11. Mẫu C12 |



Hình 2. Chủng BK7 phân lập từ mẫu C12 phân tích trên môi trường Oxford 48h (a) và nhuộm Gram (b)

### 3.3. Kháng định kết quả phân tích

Phương pháp PCR sử dụng trong phân tích này đã được kiểm nghiệm với phương pháp tiêu chuẩn và được cấp giấy xác nhận tính tương đồng của phương pháp tiêu chuẩn [13].

Ở đây, chúng tôi tiến hành khẳng định lại các chủng *L. monocytogenes* phân lập từ các mẫu tăng sinh cho phản ứng dương tính với phân tích PCR bằng kiểm tra khuẩn lạc và bằng kỹ thuật 16S rDNA. Các dịch tăng sinh dương tính được quét lên môi trường thạch Oxford, nuôi ở 37°C trong 48 giờ. Trên môi trường thạch Oxford, toàn bộ các mẫu tăng sinh dương tính tạo thành các khuẩn lạc màu đen hoặc xanh đen đặc trưng (hình 2a). Các chủng phân lập được trên môi trường

Oxford được nhuộm Gram. Kết quả nhuộm cho thấy đây là vi khuẩn Gram dương, không hình thành capsul, không sinh bào tử (hình 2b).

DNA thu được từ các khuẩn lạc tách từ môi trường Oxford của các dịch tăng sinh dương tính được dùng làm khuôn cho phản ứng nhân đoạn gen 16S rDNA với cặp mồi 16S/F. Sản phẩm PCR với đoạn mồi này được tinh sạch, xác định trình tự và cho thấy mức tương đồng với các trình tự 16S rDNA khác đã được công bố (bảng 4,5). Kết quả này chứng minh các khuẩn lạc đen trên môi trường Oxford thu được từ các dịch tăng sinh dương tính với đoạn gen *hlyA* chính là *L.monocytogenes*. Vì thế mức độ nhiễm *L.monocytogenes* trong các sản phẩm thịt phân tích được xác nhận là 11/49 mẫu phân tích.

**Bảng 4.** So sánh trình tự chủng BK7 thu từ mẫu C12

| Accession              | Description                                                             | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|----------------|---------|-----------|
| <a href="#">F01121</a> | <i>Listeria monocytogenes</i> strain EGD, complete genome, segment 9/12 | 355       | 995         | 100%           | 0.0     | 100%      |
| <a href="#">F01122</a> | <i>Listeria monocytogenes</i> strain EGD, complete genome, segment 8/12 | 355       | 995         | 100%           | 0.0     | 100%      |
| <a href="#">F01123</a> | <i>Listeria monocytogenes</i> strain EGD, complete genome, segment 2/12 | 355       | 1991        | 100%           | 0.0     | 100%      |
| <a href="#">F01124</a> | <i>Listeria monocytogenes</i> partial 16S rRNA gene, isolate 97         | 355       | 995         | 100%           | 0.0     | 100%      |
| <a href="#">F01125</a> | <i>Listeria monocytogenes</i> partial 16S rRNA gene, isolate 44         | 355       | 995         | 100%           | 0.0     | 100%      |
| <a href="#">F01126</a> | <i>Listeria monocytogenes</i> strain EGD, complete genome segment 11/12 | 355       | 1991        | 100%           | 0.0     | 100%      |
| <a href="#">F01127</a> | <i>Listeria monocytogenes</i> str. 4b F2365, complete genome            | 355       | 5973        | 100%           | 0.0     | 100%      |
| <a href="#">F01128</a> | <i>Listeria monocytogenes</i> 23S rRNA gene, strain ATCC 19115          | 362       | 989         | 100%           | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">F01129</a> | <i>Listeria monocytogenes</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  | 362       | 989         | 100%           | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">F01130</a> | <i>Listeria monocytogenes</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  | 362       | 981         | 100%           | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">F01131</a> | <i>Listeria monocytogenes</i> gene for 16S ribosomal RNA                | 372       | 979         | 100%           | 0.0     | 99%       |
| <a href="#">F01132</a> | <i>Listeria monocytogenes</i> DNA for 16S ribosomal RNA                 | 372       | 979         | 100%           | 0.0     | 99%       |

**Bảng 5.** Độ tương đồng của trình tự 16 S rDNA chủng BK7

| Chủng/mẫu | Độ tương đồng |
|-----------|---------------|
| L 1/A11   | 98%           |
| L 4/B11   | 99%           |
| L 6/B13   | 100%          |
| BK 1/B23  | 99%           |
| BK 4/A31  | 98%           |
| BK 5 /A32 | 98%           |
| BK 7/C12  | 100%          |
| VN1/M1-2  | 99%           |
| VN2/M1-6  | 100%          |
| VN3/M2-12 | 98%           |
| VN4/M2-14 | 100%          |

Kết quả khảo sát bước đầu các mẫu sản phẩm thịt có trên thị trường cho thấy sự nhiễm *L.monocytogenes* ở mức cần phải quan tâm. Hiện nay, *L.monocytogenes* chưa được quan tâm nhiều trong các vấn đề an toàn vệ sinh thực phẩm, nhưng nguy cơ nhiễm loại vi khuẩn này trong các thực phẩm, đặc biệt là các thực phẩm ăn liền như trong phân tích này là có thật. Đây là công bố đầu tiên về mức nhiễm loại vi khuẩn này trong thực phẩm trên thị trường Hà nội. Cần thiết có các khảo sát trên diện rộng hơn về mức độ nhiễm *L.monocytogenes* trên thực phẩm hiện nay để có các giải pháp cần thiết bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

*Lời cảm ơn.* Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự tài trợ của đề tài AP05\Prj3\Nr01.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Posfay-Barbe K. M. - Listeriosis, *Pediatrics in Review*, **25** (2004) 151-159.
2. Herman L. M. F., Block J. H. G. E. d. and Moermans R. J. B. - Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 25 milliliters of raw milk by a two-step PCR with nested primers, *App. Environ. Microbiol.* **61** (1995) 817-819.
3. Rodríguez-Lazaro D., Hernandez M., Scotti M., Esteve T., Vazquez-Boland J. A. and Pla M. - Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: Assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and amplifluor technology, *App. Environ. Microbiol.* **70** (2004) 1366-1377.

4. Sachse K. and Frey J. - PCR detection of microbial pathogens: methods and protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2003, pp. 347.
5. Kawasaki S., Horikoshi N., Okada Y., Takeshita K., Sameshima T. and Kawamoto S. - Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples, *J. Food Prot.* **68** (2005) 551-556.
6. Wu S.-J. and Kado C. I. - Preparation of milk samples for PCR analysis using a rapid filtration technique, *J. App. Microbiol* **96** (2004) 1342-1346.
7. Makino S.-I., Okada Y. and Maruyama T. - A new method for direct detection of *Listeria monocytogenes* from foods by PCR, *App. Environ. Microbiol* **61** (1995) 3745-3747.
8. Nguyễn Kim Hoa - Phát triển kỹ thuật PCR trong phân tích vi sinh vật gây bệnh thực phẩm, Luận văn Thạc sỹ, Đại học Bách khoa Hà Nội, 2004.
9. Sachse K. and Frey J. - PCR detection of microbial pathogens: methods and protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2003, pp. 347.
10. Xuan-Hung Nguyen, Xuan Sam Nguyen, Kim-Anh To - Simple DNA extraction for polymerase chain reaction (PCR) detection of pathogen *Listeria monocytogenes* in milk products, Proceeding of 12<sup>th</sup> regional symposium on Chemical Engineering, Hanoi, Nov. 2005, pp. 213-218.
11. Nguyễn Minh Thực - Xây dựng quy trình phân tích nhanh vi khuẩn *Listeria monocytogenes* trên sản phẩm thịt chế biến. Ứng dụng quy trình phân tích khảo sát mức độ nhiễm *L. monocytogenes* trên một số thực phẩm nguy cơ, Luận văn tốt nghiệp, Đại học Bách khoa Hà Nội, 2006.
12. Trần Ngọc Hân - Các thông số ảnh hưởng đến hệ thống xử lý kết hợp các hợp chất nitơ và cấu trúc hệ vi sinh vật trong hệ thống, Luận văn Thạc sỹ, Đại học Bách khoa Hà Nội, 2004.
13. Tô Kim Anh et al. - Development and validation of DNA-based kits for rapid detection of pathogen bacteria *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* applied in food safety control, Project final evaluation report, Hanoi University of Technology, 2007.

## SUMMARY

### PRIMARY INVESTIGATION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* INFECTION IN FOODS IN HANOI MARKET USING POLYMERASE CHAIN REACTION

Using PCR techniques developed with LM-F76, LM-R543 primers, the investigation of the infection of *L. monocytogenes* was done with 165 food samples including 116 dairy- and 49 meat-based foods. The PCR analysis showed no contamination with *L. monocytogenes* was detected in dairy samples, in contrary, 11/49 meat samples was positive with *L. monocytogenes*. This result was verified by identification of the strains isolated from positive sample on Oxford agar with 16S rDNA technique. The result confirmed that all strains isolated from PCR positive samples were identified as *L. monocytogenes*. This primary analysis gave a first warning to the contamination risk of *L. monocytogenes* in food in Hanoi market. It demands a widely investigation for the dead bacterium infection risk in the marketed foods.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 12 tháng 10 năm 2007

Đại học Bách khoa Hà Nội.