

DETECTION OF *Salmonella* spp. IN FOOD BY LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION) METHOD

Nguyen Pham Truc Phuong*, Doan Thi Quynh Huong, Nguyen Van Luong

Research and Development Center for Hi-tech Agriculture

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 27/9/2021 Revised: 10/01/2022 Published: 12/01/2022	Method for early and rapid detection of foodborne pathogens caused by <i>Salmonella</i> bacteria will help control contaminated food in the market. Therefore, in this study, a procedure for detecting <i>Salmonella</i> in foods by LAMP technique has been developed to quickly and accurately detect strains of <i>Salmonella</i> spp. based on the <i>invA2</i> primer set specifically for the <i>invA</i> gene region of <i>Salmonella</i>. The products were visualised directly by colour changes of the reaction. Positive results were indicated by green fluorescence and negative by orange colour. The test was further evaluated for specificity, sensitivity. The optimized LAMP protocol include concentrations of primers F3B3/FIPBIP 200nM/1600nM (1:8) and Betaine 0,8M, 60 minutes heating at 63°C, the specificity of LAMP protocol for the detection of <i>Salmonella</i> spp. was 100% while sensitivity was 5pg/reaction (on DNA template), 4.1x10¹CFU/ml (on bacterial strain). The results were compared with those obtained by realtime PCR.
KEYWORDS Loop Mediated Isothermal Amplification <i>invA</i> gene on <i>Salmonella</i> <i>Salmonella enteritidis</i> Food SYBR® Green I nucleic acid gel stain	

TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH PHÁT HIỆN VI KHUẨN *Salmonella* spp. GÂY BỆNH TRÊN THỰC PHẨM BẰNG KỸ THUẬT LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION)

Nguyễn Phạm Trúc Phương*, Đoàn Thị Quỳnh Hương, Nguyễn Văn Lượng

Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 27/9/2021 Ngày hoàn thiện: 10/01/2022 Ngày đăng: 12/01/2022	Việc phát hiện sớm và nhanh các mầm bệnh trên thực phẩm do vi khuẩn <i>Salmonella</i> gây ra sẽ giúp kiểm soát được thực phẩm bán trên thị trường. Vì vậy, trong nghiên cứu này đã xây dựng quy trình phát hiện <i>Salmonella</i> trong các loại thực phẩm bằng kỹ thuật LAMP để phát hiện nhanh và chính xác các chủng vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. dựa trên bộ mồi <i>invA2</i> chuyên biệt cho vùng gen <i>invA</i> của vi khuẩn <i>Salmonella</i>. Sau quá trình tối ưu các thành phần và điều kiện cần thiết như tỉ lệ mồi F3B3/FIPBIP 200nM/1600nM (1:8), nồng độ Betaine 0,8M, nhiệt độ 63°C và thời gian là 45 phút, quy trình LAMP phát hiện <i>Salmonella</i> spp. có độ đặc hiệu kỹ thuật 100%, độ nhạy kỹ thuật trên nồng độ DNA là 5pg/phản ứng; độ nhạy kỹ thuật của LAMP trên chủng khuẩn là 4,1x10¹CFU/ml. Độ nhạy của xét nghiệm LAMP được so sánh với phản ứng realtime PCR.
TỪ KHÓA Kỹ thuật LAMP Gen <i>invA</i> <i>Salmonella enteritidis</i> Thực phẩm SYBR® Green I	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.5085>

* Corresponding author. Email: trucphuongnguyen1206@gmail.com

1. Giới thiệu

Các loại thực phẩm có nguy cơ bị nhiễm *Salmonella* cao là thịt gia cầm, sản phẩm thịt, trứng và các sản phẩm từ trứng, thủy hải sản. Hầu hết các tiêu chuẩn an toàn vệ sinh thực phẩm của Việt Nam, thế giới đều không cho phép sự có mặt của *Salmonella* trong thực phẩm. Những *Salmonella* gây ngộ độc thường gặp là *S. typhimurium*, *S. choleraesuis* và *S. enteritidis* [1]. Do đó, việc chuẩn đoán chính xác và nhanh chóng vi khuẩn *Salmonella* sẽ có ý nghĩa rất quan trọng về mặt bảo vệ sức khỏe, vệ sinh công cộng, dự phòng bệnh truyền nhiễm [2]. Phương pháp kiểm soát *Salmonella* trong thực phẩm ở Việt Nam và trên thế giới là một quy trình vi sinh, đòi hỏi nhiều bước nuôi cấy phụ, sau đó là xét nghiệm sinh hóa và huyết thanh học (ISO 6579-1: 2017). Phương pháp này tốn nhiều thời gian (5 đến 7 ngày) và rất tốn công sức. Một số kỹ thuật phát hiện *Salmonella* dựa trên PCR cũng được thiết lập, chẳng hạn như immuno-PCR, real-time PCR và multiplex PCR [2], [3]. Các phương pháp xét nghiệm miễn dịch dựa trên kháng nguyên cho kết quả đặc hiệu, chính xác, thời gian phát hiện ngắn (2 ngày). Tuy nhiên, các phương pháp này yêu cầu sử dụng thiết bị và hóa chất đắt tiền. Vì vậy, phát triển và ứng dụng một phương pháp chẩn đoán nhanh, đáng tin cậy, ít tốn kém và có thể phát hiện sàng lọc *Salmonella* ngay tại hiện trường là yêu cầu cấp thiết. Kỹ thuật LAMP là phương pháp khuếch đại DNA (tổng hợp một đoạn DNA lớn) mà không cần các chu trình biến nhiệt được phát triển bởi Notomi và cộng sự. (2000), thường ứng dụng để phát hiện các virus, vi khuẩn,...[4]. LAMP khác với PCR ở chỗ sử dụng bốn hoặc sáu đoạn mồi để thực hiện khuếch đại gen mục tiêu, kỹ thuật sử dụng một bước nhiệt độ duy nhất ở 60°C - 65°C trong khoảng 15-60 phút. Sản phẩm khuếch đại DNA - vòng mới được tạo ra với lượng lớn [5], [6]. Do đó, LAMP thực hiện nhanh chóng, đơn giản hơn PCR. Hơn nữa, bởi vì LAMP tổng hợp một lượng lớn DNA, các sản phẩm có thể được phát hiện bằng mắt thường do sự kết tủa của phản ứng tạo muối pyrophosphate ($Mg_2P_2O_7$) hoặc phát quang khi nhuộm bằng thuốc nhuộm [5], [7]. Kỹ thuật LAMP sẽ phù hợp cho các hoạt động thực hiện bên ngoài phòng thí nghiệm cũng như phòng thí nghiệm với trang thiết bị còn hạn chế [8]. Kết quả nghiên cứu này sẽ cung cấp cơ sở khoa học cho việc lựa chọn phương pháp chẩn đoán phân tử tốt nhất để phát hiện *Salmonella* nhiễm trên thực phẩm. Trong bài báo này, LAMP ứng dụng để phát hiện nhanh *Salmonella* spp. trên thực phẩm nhằm cung cấp cơ sở khoa học cho việc lựa chọn phương pháp sàng lọc nhanh *Salmonella* hiệu quả và tiết kiệm chi phí chẩn đoán, từ đó góp phần xây dựng phương án phòng ngừa và kiểm soát thực phẩm bẩn (nhiễm vi sinh vật gây hại) thích hợp.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Chủng vi sinh vật: Các chủng dùng trong nghiên cứu được liệt kê ở Bảng 1.

Môi: sử dụng 4 bộ môi tham khảo từ nghiên cứu của HaraKudo và cộng sự (2005), Chen và cộng sự (2011), Wang và cộng sự (2013), Masoji và cộng sự (2017) [9]-[12] dựa trên trình tự gen *invA* thu nhận từ GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> (với từ khóa “*Salmonella typhimurium* InvA (*invA*) gene”)) để lựa chọn bộ môi cho phản ứng LAMP liệt kê ở Bảng 2.

Môi cho phản ứng PCR là cặp mồi S139/S141 (Bảng 2) khuếch đại cho trình tự gen mục tiêu *invA* [13].

Bảng 1. Các chủng khuẩn sử dụng trong bài báo

STT	Tên chủng	Số lượng	Nguồn gốc	Ký hiệu
1	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	1	MicroBiologics	ATCC 14028
2	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	1	MicroBiologics	ATCC 13076
3	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC1911	1	MicroBiologics	ATCC 1911
4	<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	MicroBiologics	ATCC 25922
5	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1	MicroBiologics	ATCC 6538

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác nhận DNA sử dụng cho phản ứng LAMP là từ chủng khuẩn *Salmonella* spp.

Hai chủng khuẩn *Salmonella* (Bảng 1) được hoạt hóa và tăng sinh trong môi trường Buffered peptone water (BPW) (Himedia, Ấn Độ) ở $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ trong (18 ± 2) giờ. Tiếp theo sẽ tiến hành ly trích DNA của các chủng vi khuẩn này bằng nhiệt ở 100°C trong 15 phút để thực hiện phản ứng PCR với trình tự mỗi S139/S141 với các thành phần phản ứng như sau: 5 μl OneTaq Standard Reaction buffer (5X); 0,125 μl One Taq DNA polymerase (5000 U/ml) (NEB, Mỹ); 0,5 μl dNTPs (10mM) (Thermo Scientific™, Lithuania); 1 μl mỗi S139/S141 (10 μM) (IDT, Mỹ); 2 μl DNA vi khuẩn tách chiết và bổ sung thêm nuclease- free water (Invitrogen, Mỹ) để đủ 25 μl . Phản ứng khuếch đại gen *invA* được thực hiện trên máy Proflex PCR System. Quy trình phản ứng PCR là 94°C (30 giây), sau đó là 40 chu kỳ 95°C (30 giây), 55°C (30 giây), 68°C (60 giây), 1 chu kỳ 68°C (5 phút), giữ mẫu ở 4°C . Sản phẩm khuếch đại được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1,5%.

Bảng 2. Các cặp mồi sử dụng trong khảo sát phản ứng LAMP

Tên	Mồi	Trình tự (5' – 3')	TLTK
<i>invA-1</i>	FIP	gACgACTggTACTgATCgAT-AgTTTTTCAACgTTTCCTgCgg	Hara-Kudo và cộng sự, 2005 [2]
	BIP	CCggTgAAATTATCgC-CACACAAAACCCACCgCCAgg	
	F3	ggCgATATTggTgTTTATgggg	
	B3	AACgATAAACTggACCACgg	
	LF	gACgAAAgAgCgTggTAATTAAC	
	LB	gggCAATTCgTTATTggCgATAg	
<i>invA-2</i>	FIP	gCgCggCATCCgCATCAATA- TgCCCggTAAACAGATgAgT	Chen và cộng sự, 2011 [3]
	BIP	gCgAACggCgAAgCgTACTg- TCgCACCGTCAAAGgAAC	
	F3	CggCCCgATTTTCTCTgg	
	B3	CggCAATAgCgTCACCTT	
	LF	ggCCTTCAAATCggCATCAAT	
	LB	gAAAaggAAAgCCAgCTTTACg	
<i>invA-3</i>	FIP	gCgAggTTTggCggCTgATATTTTTTCgCgACgACAAAATCTgg	Wang và cộng sự, 2013 [4]
	BIP	AACTTTAgCgCAAggTgCCTCTTTTgCCggTAAACTACACgATgA	
	F3	CATg	
	F3	CTgggCgTTTTTTTgTCCTg	
	B3	gggAAggTTAAggAgggTgA	
	LF	AggCTTCgCgTACAgAgg	
<i>invA-4</i>	LB	CACgTCAGCAA AgCgTACC	Masoji và cộng sự, 2017 [5]
	FIP	gCgCggCATCCgCATCAATA-TCTggATggTATgCCCgg	
	BIP	gAACggCgAAgCGTACTggAC-ATCgCACCGTCAAAGgAA	
	F3	gAACgTgTCgCggAAgTC	
	B3	CggCAATAgCgTCACCTT	
S139/S141	S139	GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA	Rahn và cộng sự [6]
	S141	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	

2.2.2. Chọn lọc mồi LAMP đặc hiệu cho vùng gen *invA* để phát hiện *Salmonella* spp. trong thực phẩm

Kiểm tra *insilico* các mồi: Trình tự mồi F3B3 của 4 bộ mồi *invA-1*, *invA-2*, *invA-3*, *invA-4* (Bảng 2) được kiểm tra trên phần mềm trực tuyến <http://insilico.ehu.eus/PCR/index.php> để kiểm tra khả năng phát hiện các serotype vi khuẩn *Salmonella* spp. của bộ mồi trên lý thuyết.

Các bộ mồi được kiểm tra khả năng khuếch đại gen mục tiêu bằng phản ứng LAMP thực hiện trên nền mẫu DNA ly trích từ chủng chuẩn *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; *Salmonella enteritidis* ATCC 13076. Thành phần phản ứng LAMP ở nhiệt độ 65°C trong 60 phút gồm: 1X Isothermal Amplification Buffer II (10X); 6mM MgSO_4 (100mM); 320 U mL^{-1} Bst 3.0 polymerase (8000 U mL^{-1}) (NEB, Mỹ); 1,4 mM dNTP (25 mM) (Thermo Scientific™,

Lithuania); 1M Betaine (5M) (Sigma, Đức); 1,6 μ M FIP/BIP (40 μ M) (IDT, Mỹ); 0,2 μ M F3/B3 (5 μ M) (IDT, Mỹ); 0,4 μ M LoopF/LoopB (10 μ M) (IDT, Mỹ); 50 ng DNA; Nuclease- free water. Tiếp theo, tăng nhiệt độ lên 80 °C trong 10 phút để kết thúc phản ứng LAMP. Hiệu quả khuếch đại phản ứng LAMP sẽ đánh giá bằng chất nhuộm SYBR Green I và quan sát phản ứng dương tính nếu chuyển màu từ cam nhạt sang xanh dưới tia UV 310 nm. Sản phẩm LAMP còn được nhuộm với Gelred và điện di trên gel agarose 1,5% ở 80 V trong 60 phút, kết quả được quan sát và chụp ảnh bằng máy Gel Doc XR+.

2.2.3. Xây dựng và tối ưu hóa quy trình LAMP phát hiện vi khuẩn *Salmonella* spp. gây bệnh trên thực phẩm

Sau khi chọn được bộ môi hoạt động tốt nhất trong 4 bộ môi khảo sát, nhóm tiến hành tối ưu 04 yếu tố chính của phản ứng LAMP là: nồng độ môi, nồng độ Betaine, nhiệt độ ủ, thời gian phản ứng. Phản ứng LAMP sẽ tiến hành trên nền DNA ly trích từ chủng chuẩn *Salmonella* (Bảng 1). Tỷ lệ nồng độ môi được khảo sát bằng phương pháp ma trận 5 x 5, theo đó nồng độ cuối cùng của các môi lần lượt là 100, 200, 300, 400, 500 nM. Nồng độ Betaine cho phản ứng LAMP sẽ khảo sát từ 0,6 M - 1,4 M, mỗi bước nhảy là 0,2 M. Nhiệt độ ủ được khảo sát ở các mức lần lượt là 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C. Thời gian của phản ứng được khảo sát lần lượt là 15, 30, 45, 60 phút với nhiệt độ, tỷ lệ môi và nhiệt độ đã tối ưu trước đó.

2.2.4. Đánh giá độ đặc hiệu kỹ thuật của phản ứng LAMP

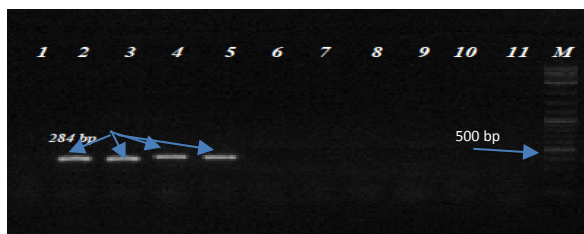
Độ đặc hiệu là độ chính xác của phản ứng LAMP khi kiểm tra với DNA khuôn mẫu khác gây bệnh trên thực phẩm không phải là *Salmonella* spp. Phản ứng LAMP được kiểm tra với DNA ly trích từ 3 chủng khuẩn khác nhau thường nhiễm trên thực phẩm như *Listeria monocytogenes* ATCC1911, *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, 2 chủng *Salmonella* (Bảng 1) và mẫu DNA ly trích từ mẫu thực phẩm không nhiễm bệnh để đánh giá độ đặc hiệu.

2.2.5. Đánh giá độ nhạy kỹ thuật của phản ứng LAMP

Độ nhạy kỹ thuật được đánh giá qua chỉ số LOD (limit of detection), là giới hạn lượng dịch mẫu phân tích ít nhất có trong chất nền đặc trưng có thể cho kết quả dương tính. Để thực hiện việc khảo sát độ nhạy kỹ thuật hay LOD của quy trình LAMP, phản ứng được tiến hành với điều kiện đã tối ưu ở nội dung 2.2.3 với nồng độ DNA từ 5 pg đến 50000 pg. Hơn nữa, độ nhạy kỹ thuật của phản ứng LAMP cũng được khảo sát trên chủng *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 nuôi cấy trong môi trường buffered peptone water (BPW) ở (37 $\pm$ 1)°C trong (18 $\pm$ 2) giờ và pha loãng 10 lần liên tiếp trong đệm PBS (pH 7.0) đến mật độ 10⁻⁷. Bên cạnh đó, cũng so sánh hiệu quả phát hiện cùng gen mục tiêu (gen *invA*) của phương pháp LAMP với phản ứng realtime PCR (Kit thương mại).

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Xác nhận DNA sử dụng cho phản ứng LAMP là từ chủng khuẩn *Salmonella* spp.



Hình 1. Kết quả PCR khuếch đại DNA vi khuẩn *Salmonella* spp. của cặp môi S139/S141

Giếng (1): DNA ly trích từ mẫu thực phẩm không nhiễm bệnh; Giếng (2)(3): DNA ly trích từ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; Giếng (4) (5) DNA ly trích từ *Salmonella enteritidis* ATCC 13076; Giếng (6)(7): DNA ly trích từ *Escherichia coli* ATCC 25922; Giếng (8)(9): DNA ly trích từ *Staphylococcus*

aureus ATCC 6538; *Giếng* (10)(11): DNA ly trích từ *Listeria monocytogenes* ATCC1911; *M*: thang DNA

Chủng khuẩn *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 được hoạt hóa và tăng sinh ở $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ trong (18 ± 2) h. Tiếp theo sẽ tiến hành ly trích DNA của 2 chủng *Salmonella* này và 3 chủng khuẩn (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC1911) để phân tích bằng PCR với bộ mồi S139/S141 (khuếch đại trình tự gen *invA*). Mồi S139/S141 khuếch đại hầu hết DNA ly trích từ các chủng *Salmonella* spp. và không cho sản phẩm khuếch đại với DNA ly trích từ 3 chủng khuẩn còn lại trong phản ứng PCR.

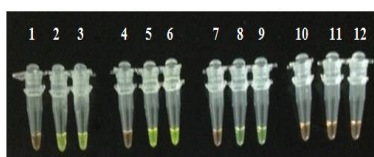
Kết quả điện di ở hình 1 cho thấy kết quả phản ứng PCR thực hiện với cặp mồi S139/S141, sản phẩm thu được ở mẫu DNA ly trích từ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 có vạch DNA rõ nét có kích thước tương ứng gần với vạch 284 bp với kích thước sản phẩm PCR dự kiến (trình tự gen mục tiêu *invA* được công bố bởi Rahn và cộng sự (1991)) [13]. Mặt khác, cặp mồi S139/S141 không cho sản phẩm khuếch đại với các DNA ly trích từ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Dựa vào kết quả này, DNA ly trích từ chủng khuẩn *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 được sử dụng làm nguồn DNA để xây dựng quy trình LAMP phát hiện *Salmonella* trong bài báo này.

3.2. Chọn lọc mồi LAMP đặc hiệu cho vùng gen *invA* để phát hiện *Salmonella* spp. trong thực phẩm

Mồi F3B3 của các bộ mồi *invA1*; *invA2*; *invA3*; *invA4* được kiểm tra trên phần mềm trực tuyến <http://insilico.ehu.eus> về khả năng phát hiện các serotype của *Salmonella* spp. của bộ mồi trên lý thuyết. Kết quả kiểm tra được thể hiện qua Bảng 3 cho thấy cặp mồi F3/B3 của bộ mồi *invA2* phát hiện được 42/45 sevovar của *Salmonella*, cao hơn so với các bộ mồi còn lại lần lượt là *invA1* (phát hiện 40/45 sevovar); *invA3* (phát hiện 23/45 sevovar); *invA4* (phát hiện 17/45 sevovar).

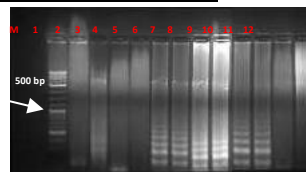
Bảng 3. Kết quả kiểm tra khả năng phát hiện các serotype vi khuẩn *Salmonella* spp. của các bộ mồi *invA1*, *invA2*, *invA3*, *invA4* trên lý thuyết

Bộ mồi	Số lượng sevovar phát hiện
<i>invA1</i>	40/45
<i>invA2</i>	42/45
<i>invA3</i>	23/45
<i>invA4</i>	17/45



(a)

Ống (1) (4) (7) (10): chứng âm bộ mồi *invA1*; *invA2*; *invA3*; *invA4*; Ống (2) (3): hoạt động khuếch đại của bộ mồi *invA1* trên DNA ly trích từ *Salmonella enteritidis* ATCC 13076; Ống (5) (6): hoạt động khuếch đại của bộ mồi *invA2* trên DNA ly trích từ *Salmonella enteritidis* ATCC 13076; Ống (8) (9): hoạt động khuếch đại của bộ mồi *invA3* trên DNA ly trích từ *Salmonella enteritidis* ATCC 13076; Ống (11) (12): hoạt động khuếch đại của bộ mồi *invA4* trên DNA ly trích từ *Salmonella enteritidis* ATCC 13076



(b)

Giếng (1) (2) (3) (4): mẫu âm của bộ mồi *invA1*, *invA2*, *invA3*, *invA4*; Giếng (5) (6): DNA ly trích từ *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 với bộ mồi *invA1*; Giếng (7) (8): DNA ly trích từ *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 với bộ mồi *invA2*; Giếng (9) (10): DNA ly trích từ *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 với bộ mồi *invA3*; Giếng (11) (12): DNA ly trích từ *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 với bộ mồi *invA4*; Giếng M: Thang DNA

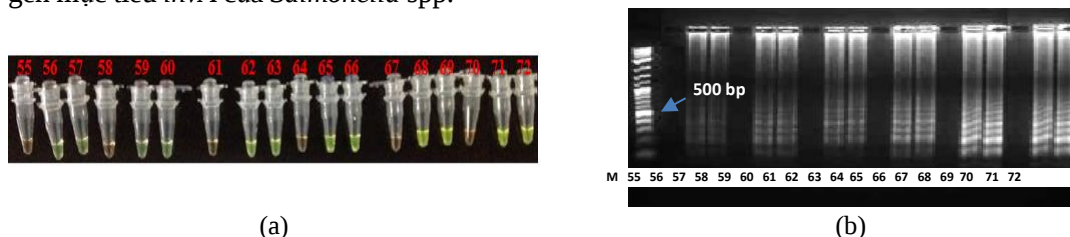
Hình 2. Kiểm tra độ hoạt động thực tế của mỗi *invA1*, *invA2*, *invA3*, *invA4* để phát hiện vi khuẩn *Salmonella* spp: (a) nhận biết bằng SYBR GREEN I và (b) nhận biết bằng điện di trên gel agarose

Kiểm tra độ hoạt động thực tế của các môi *invA1*, *invA2*, *invA3*, *invA4* trên phản ứng LAMP. Theo Zhang và cộng sự (2012) báo cáo phản ứng LAMP dương tính có màu xanh khi có sự hiện diện của SYBR Green I, ngược lại hình thành màu cam [14]. Kết quả hình 2a cho thấy, SYBR Green I cho vào ống khi phản ứng kết thúc, các ống (2) (3), ống (5) (6) và ống (8) (9) tương ứng với bộ mỗi lần lượt là *invA1*, *invA2*, *invA3* đều cho màu xanh đặc trưng nhưng ở bộ mỗi *invA3* cho màu xanh nhạt hơn so với bộ mỗi *invA1*, *invA2*. Riêng ở ống (11) (12) tương ứng với bộ mỗi *invA4* cho màu cam. Điều này chứng tỏ bộ mỗi *invA1*, *invA2*, *invA3* có khả năng khuếch đại trình tự mục tiêu gen *invA* trên DNA ly trích từ *Salmonella enteritidis* ATCC 13076. Nhưng bộ mỗi *invA4* không khuếch đại được trình tự gen *invA* mục tiêu trên DNA ly trích từ *Salmonella enteritidis* ATCC 13076. Tuy nhiên, bộ mỗi *invA1*, *invA2* cho hiệu suất khuếch đại trình tự mục tiêu gen *invA* cao hơn bộ mỗi *invA3*. Mặt khác, phản ứng LAMP cũng được kiểm chứng bằng điện di trên gel agarose 1,5%, nhuộm với Gelred, hiển thị ở bước sóng 310 nm (Hình 2b) cho thấy bộ mỗi *invA2* có khả năng khuếch đại trình tự gen mục tiêu *invA* cao nhất (Giếng 7,8 băng DNA đậm nhất). Do đó, lựa chọn bộ mỗi *invA2* là bộ mỗi sử dụng cho phản ứng LAMP phát hiện *Salmonella* spp.

Từ kết quả kiểm tra đánh giá khả năng phát hiện các serotype vi khuẩn *Salmonella* spp. và kiểm tra độ hoạt động thực tế của các môi, chúng tôi chọn bộ mỗi *invA2* sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Xây dựng và tối ưu hóa quy trình LAMP phát hiện vi khuẩn *Salmonella* spp. gây bệnh trên thực phẩm

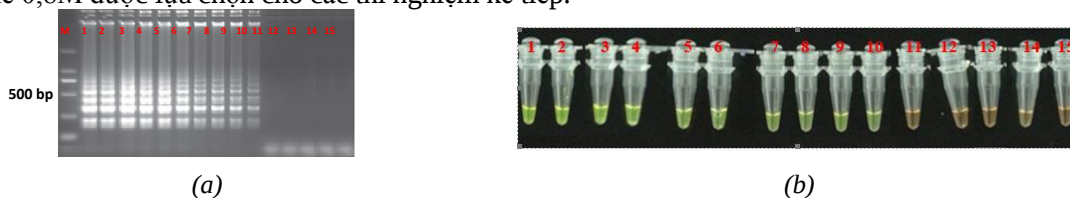
Ihira và cộng sự (2004) đã công bố rằng, tỉ lệ mỗi dao động lớn sẽ ảnh hưởng đến độ nhạy của phản ứng LAMP [15]. Ảnh hưởng của tỉ lệ mỗi đến sản phẩm LAMP trong nghiên cứu này được nhận biết bằng chất chỉ thị màu SYBR Green I và phân tích trên gel agarose. Kết quả hình 3a và 3b cho thấy, DNA đã được khuếch đại ngay khi tỉ lệ mỗi là F3B3/FIPBIP là 1:4 (50nM/150nM) nhưng lượng sản phẩm tạo thành rất thấp. Khi tăng tỉ lệ nồng độ mỗi lên thì lượng ADN được khuếch đại nhiều hơn. Với tỉ lệ mỗi ngoài/mỗi trong là 1:8 (200nM/1600nM) thì phản ứng LAMP cho hàm lượng DNA được khuếch đại ổn định. Vậy tỉ lệ nồng độ mỗi ngoài và mỗi trong (F3B3/FIPBIP) là 200nM/1600nM (1:8) là tối ưu nhất cho phản ứng LAMP để phát hiện trình tự gen mục tiêu *invA* của *Salmonella* spp.



Hình 3. Ảnh hưởng của tỉ lệ F3/B3 và FIP/BIP của bộ mỗi *invA2* đến sản phẩm phản ứng LAMP: (a) nhận biết bằng chất chỉ thị màu SYBR Green và (b) nhận biết trên gel agarose
Giếng (ống) 55, 58, 61, 64, 67, 70: chứng âm; Giếng (ống) 56, 57 (200/200 nM); Giếng (ống) 59, 60 (200/400 nM); Giếng (ống) 62, 63 (200/800 nM); Giếng (ống) 65, 66 (200/1200 nM); Giếng (ống) 68, 69 (200/1600 nM); Giếng (ống) 71,72: (200/2000 nM)

Nghiên cứu Chen và cộng sự (2011) đã chỉ ra rằng, betain có tác dụng làm tăng hiệu quả khuếch đại và tăng tính đặc hiệu của phản ứng LAMP [10]. Tuy nhiên, khi sử dụng nồng độ betain cao có thể làm giảm hoạt tính của enzyme DNA polymerase dẫn đến giảm hiệu suất phản ứng. Trong

nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của nồng độ betaine từ 0,6 M - 1,4 M đến hiệu quả khuếch đại của phản ứng LAMP. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nồng độ betain đến phản ứng LAMP cho thấy sản phẩm khuếch đại tương ứng với các nồng độ betain 0,6 M; 0,8 M; 1 M; 1,2 M; 1,4 M được khảo sát trong phản ứng LAMP đều làm thay đổi màu SYBR Green I (màu cam) sang màu xanh (Hình 4b). Khi chạy điện di sản phẩm (Hình 4a) cho thấy, khi nồng độ betain trong các phản ứng tăng lên, các băng ADN xuất hiện đậm và rõ ràng hơn. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ betain 1,2 M; 1,4 M, sản phẩm khuếch đại mờ dần so với các nồng độ thấp hơn. Do đó, nồng độ betaine 0,8M được lựa chọn cho các thí nghiệm kế tiếp.



(a) (b)
Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ betain đến phản ứng LAMP:

(a) nhận biết bằng điện di trên gel agarose và (b) nhận biết bằng SYBR Green I
M: Thang DNA; Giếng (ống) 1,2: nồng độ betain 0,6 M; Giếng (ống) 3,4: nồng độ betain 0,8 M; Giếng (ống) 5,6: nồng độ Betain 1M; Giếng (ống) 7,8: nồng độ betain 1,2 M; Giếng (ống) 9,10: nồng độ betain 1,4 M; Giếng (ống) 11,12,13,14,25: mẫu âm



(a) (b)
Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến phản ứng LAMP:

(a) nhận biết bằng SYBR Green I và (b) nhận biết bằng điện di trên gel agarose
M: Thang DNA; Giếng (ống) 1,2: nhiệt độ 60°C; Giếng (ống) 3,4: nhiệt độ 61°C; Giếng (ống) 5,6: nhiệt độ 62°C; Giếng (ống) 7,8: nhiệt độ 63°C; Giếng (ống) 9,10: nhiệt độ 64°C; Giếng (ống) 11,12: nhiệt độ 65°C; Giếng (ống) 13,14, 15,16,17,18: đối chứng âm

Thực hiện phản ứng LAMP chỉ ở một điều kiện nhiệt độ duy nhất cho nên nhiệt độ phản ứng này phải đảm bảo phù hợp với nhiệt độ hoạt động của enzyme Bst DNA polymerase và nhiệt độ gắn môi. Do đó, để xác định nhiệt độ phản ứng tối ưu cho phản ứng LAMP khuếch đại gen *invA* thì các phản ứng được tiến hành ở các giá trị nhiệt độ khác nhau là 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C. Kết quả ảnh hưởng nhiệt độ ù được thể hiện ở hình 5a cho thấy phản ứng LAMP ở các khoảng nhiệt độ từ 60 - 65°C, mức tăng 1°C đều có sản phẩm khuếch đại làm thay đổi màu SYBR Green I (màu cam) chuyển sang màu xanh. Hơn nữa, khi điện di sản phẩm khuếch đại (hình 5b) cho thấy, ở tất cả các mức nhiệt độ khảo sát đều xuất hiện vạch DNA nhưng rõ và sáng nhất ở 63°C. Kết quả này khá tương đồng với các nghiên cứu đã được công bố trước đây như Chen và cộng sự (2011), Zhu và cộng sự (2008), Shao và cộng sự (2011), Tournalousse và cộng sự (2012) [10], [16]-[18]. Do vậy, nhiệt độ ù 63°C được lựa chọn để thực hiện thí nghiệm tiếp theo.

Với phương pháp LAMP, thời gian phản ứng thường là 60 phút. Tùy từng bộ môi mà thời gian thích hợp cho phản ứng diễn ra là khác nhau. Với mục đích giảm thời gian phản ứng và vẫn thu được kết quả rõ ràng, chúng tôi tiến hành khảo sát phản ứng LAMP ở 63°C với các khoảng thời gian 15, 30, 45, 60 phút. Kết thúc phản ứng LAMP, bất hoạt enzyme ở 80°C trong 10 phút. Sau đó, thực hiện việc đánh giá hiệu quả khuếch đại trong từng điều kiện bằng cách sử dụng chất nhuộm SYBR Green I (1 µL trên 25µL phản ứng) bổ sung vào phản ứng và điện di sản phẩm LAMP trên gel 1,5% agarose. Kết quả khảo sát thời gian phản ứng được thể hiện ở hình 6a và hình 6b cho thấy, ở 15 phút đã có sản phẩm khuếch đại nhưng chưa rõ ràng nhưng thời gian phản ứng tăng lên 45 phút, sản phẩm khuếch đại nhiều và rõ nét nhất. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn thời gian phản ứng là 45 phút cho các thí nghiệm tiếp theo.



(a)

(b)

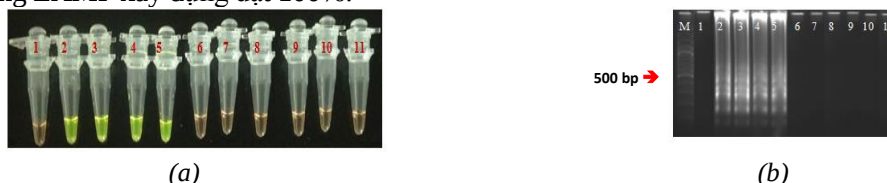
Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian đến phản ứng LAMP:

(a) nhận biết bằng SYBR Green I và (b) nhận biết bằng điện di trên gel agarose

M: thang DNA; Giếng (ống) 1,4,7,10: đối chứng âm; Giếng (ống) 2,3: sản phẩm LAMP ở 15 phút; Giếng (ống) 5,6: sản phẩm LAMP ở 30 phút; Giếng (ống) 8,9: sản phẩm LAMP ở 45 phút; Giếng (ống) 11, 12: sản phẩm LAMP ở 60 phút

3.4. Khảo sát độ đặc hiệu kỹ thuật của phản ứng LAMP

Kết quả khảo sát độ đặc hiệu được thể hiện ở hình 7 cho thấy phản ứng LAMP khi thực hiện trên DNA ly trích từ các chủng *Salmonella* spp. đều cho sản phẩm khuếch đại làm thay đổi màu SYBR Green I (màu cam) chuyển sang màu xanh (Hình 7a). Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại (Hình 7b) trên gel 1,5% agarose cho thấy phản ứng LAMP chỉ cho kết quả khuếch đại dương tính với các mẫu sử dụng DNA ly trích từ các chủng *Salmonella* spp. Ngược lại, tất cả các DNA ly trích từ các chủng khuẩn khác đều cho kết quả âm tính. Từ các kết quả này cho thấy độ đặc hiệu phản ứng LAMP xây dựng đạt 100%.



(a)

(b)

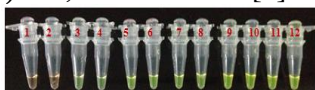
Hình 7. Độ đặc hiệu kỹ thuật của phản ứng LAMP:

(a) nhận biết bằng chỉ thị SYBR Green I và (b) nhận biết bằng điện di trên gel 1,5% agarose.

Giếng (ống) 1: chứng âm; Giếng (ống) 2,3: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076; Giếng (ống) 4,5: DNA ly trích từ *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; Giếng (ống) 6,7: DNA ly trích *Listeria monocytogenes* ATCC1911; Giếng (ống) 8,9: DNA ly trích từ *Escherichia coli* ATCC 25922; Giếng (ống) 10,11: DNA ly trích *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; M: thang DNA

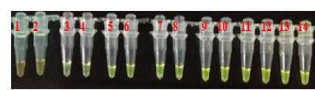
3.5. Xác định độ nhạy của phản ứng LAMP và so sánh với phản ứng realtime PCR

Phản ứng LAMP có thể phát hiện được gen mục tiêu (*invA*) trên *Salmonella* ở nồng độ DNA pha loãng từ 5 pg đến 50000 pg trong phản ứng 25 μ l (Hình 8). Bên cạnh đó, khi kiểm tra độ nhạy trên DNA ly trích từ chủng khuẩn chuẩn *Salmonella enteritidis* ATCC13076 với nồng độ 4,1 CFU/ml đến 4,1x10⁶ CFU/ml được tăng sinh trong môi trường BPW trong 18 $\pm$ 2 giờ ở 37°C, phản ứng LAMP biểu hiện khả năng phát hiện gen đích ở nồng độ 4,1x10¹CFU/ml (Hình 9). Ngưỡng phát hiện trong nghiên cứu này tương đương với nghiên cứu của Hara-Kudo và cộng sự (2005) là 5,6x10¹ CFU/ml [9].



Hình 8. Ngưỡng phát hiện của phản ứng LAMP ở nồng độ DNA từ 0 pg đến 50.000 pg nhận biết bằng chất chỉ thị SYBR Green I

Ống 1,2: 0 pg; Ống 3,4: 5 pg; Ống 5,6: 50 pg; Ống 7,8: 500 pg; Ống 9,10: 5000 pg; Ống 11,12: 50.000 pg



Hình 9. Ngưỡng phát hiện của phản ứng LAMP với DNA được ly trích từ *Salmonella enteritidis* ATCC13076 ở mật độ 4,1 CFU/ml đến 4,1x10⁶ CFU/ml nhận biết bằng chất chỉ thị SYBR Green I.

Ống 1,2: 4,1 CFU/ml; Ống 3,4: 4,1x10¹ CFU/ml; Ống 5,6: 4,1x10² CFU/ml; Ống 7,8: 4,1x10³ CFU/ml; Ống 9,10: 4,1x10⁴CFU/ml; Ống 11,12: 4,1x10⁵ CFU/ml; Ống 13,14: 10⁶ CFU/ml

Bảng 4. So sánh giới hạn phát hiện của phương pháp LAMP và realtime PCR ở nồng độ DNA từ 5g đến 50.000 pg

Phương pháp	Hàm lượng DNA (pg)				
	5	50	500	5000	50000
Realtime PCR	+	+	+	+	+
LAMP	+	+	+	+	+

Chú thích: (-): không phát hiện; (+): phát hiện

Kết quả so sánh độ nhạy phản ứng LAMP với phản ứng realtime PCR (Kit Thương mại) cùng khuếch đại gen *invA* cho thấy, cả 2 phương pháp đều có kết quả dương tính ở các nồng độ DNA khuôn từ 5g đến 50.000 pg trong thể tích 25 μ l (Bảng 4). Tương tự, cũng so sánh độ nhạy phản ứng LAMP với phản ứng realtime PCR (Kit Thương mại) với trên DNA ly trích ở mật độ vi khuẩn *Salmonella* từ 4,1 CFU/ml đến 4,1x10⁶ CFU/ml, phản ứng đều có kết quả dương tính ở tất cả các mật độ vi khuẩn khảo sát (Bảng 5). Do đó giới hạn phát hiện của phương pháp LAMP tương đương so với phương pháp realtime PCR ở nồng độ DNA khuôn là 5 pg trong phản ứng 25 μ l và mật độ vi khuẩn *Salmonella enteritidis* ATCC13076 là 4,1x10¹ CFU/ml.

Bảng 5. So sánh giới hạn phát hiện của phương pháp LAMP và realtime PCR ở mật độ *Salmonella enteritidis* ATCC13076 từ mật độ 4,1 CFU/ml đến 4,1x10⁶ CFU/ml

Phương pháp	Mật độ (CFU/ml)						
	4,1	4,1x10 ¹	4,1x10 ²	4,1x10 ³	4,1x10 ⁴	4,1x10 ⁵	4,1x10 ⁶
Realtime PCR	-	+	+	+	+	+	+
LAMP	-	+	+	+	+	+	+

Chú thích: (-): không phát hiện; (+): phát hiện

4. Kết luận

Nghiên cứu đã chọn được bộ mồi *invA*2 hoạt động hiệu quả và đặc hiệu cho vùng gen *invA* để phát hiện *Salmonella* spp. trong thực phẩm. Phản ứng LAMP với thành phần: tỉ lệ mồi trong và mồi ngoài là 1:8 tương ứng với F3/B3 (200nM) và FIP/BIP (1600nM); nồng độ betaine là 0,8 M; chu trình nhiệt là 63°C trong 45 phút và phản ứng kết thúc bằng cách tăng nhiệt độ lên 80°C trong 10 phút. Xác định được các thông số kỹ thuật của quy trình LAMP phát hiện *Salmonella* spp. trên mẫu thực phẩm như độ đặc hiệu kỹ thuật (100%), độ nhạy kỹ thuật trên nồng độ DNA là 5pg/phản ứng; độ nhạy kỹ thuật của LAMP trên chủng khuẩn nghiên cứu là 4,1x10¹CFU/ml. Giới hạn phát hiện của phương pháp LAMP tương đương so với phương pháp realtime PCR ở nồng độ DNA khuôn là 5 pg trong phản ứng 25 μ l, mật độ vi khuẩn *Salmonella enteritidis* ATCC13076 là 4,1x10¹ CFU/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] S. M. Jajere, "A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance," *Veterinary World*, vol. 12, no. 4, pp. 504-521, 2019.
- [2] M. Siala, A. Barbana, S. Smaoui, S. Hachicha, C. Marouane, S. Kammoun, G. Gdoura, and F. Messadi-Akrout, "Screening and Detecting *Salmonella* in Different Food Matrices in Southern Tunisia Using a Combined Enrichment/Real-Time PCR Method: Correlation with Conventional Culture Method," *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, 2017, Art. no. 2416, doi: 10.3389/fmicb.2017.02416.
- [3] R. Heymans, A. Vila, C. A. M. van Heerwaarden, C. C. C. Jansen, G. A. A. Castelijns, M. van der Voort, and E. G. Biesta-Peters, "Rapid detection and differentiation of *Salmonella* species, *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Enteritidis* by multiplex quantitative PCR," *Plos one*, vol. 13, no. 10, Art. no. e0206316, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0206316 October 25.
- [4] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase, "Loop-mediated isothermal amplification of DNA," *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 12, pp. e63i- e63vii, 2000.
- [5] Y. Mori, K. Nagamine, N. Tomita, and T. Notomi, "Detection of Loop-Mediated Isothermal

- Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 289, no. 1, pp. 150-154, 2001.
- [6] K. Nagamine, K. Watanabe, K. Ohtsuka, T. Hase, and T. Notomi, "Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template," *Clinical Chemistry Journals*, vol. 47, no. 9, pp. 1742-1743, 2001.
- [7] M. Goto, E. Honda, A. Ogura, A. Nomoto, and K. -I. Hanaki, "Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue," *BioTechniques*, vol. 46, pp. 167-172, 2009.
- [8] C. C. Boehme, P. Nabeta, G. Henostroza, R. Raqib, Z. Rahim, and M. Gerhardt, "Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, pp. 1936-1940, 2017.
- [9] Y. Hara-Kudo, M. Yoshino, T. Kojima, and M. Ikeda, "Loop mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 253, no. 1, pp. 155-161, 2005.
- [10] S. Chen, F. Wang, J. C. Beaulieu, R. E. Stein, and B. Ge, "Rapid detection of viable salmonellae in produce by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 12, pp. 4008-4016, 2011.
- [11] Y. -Z. Wang and D.-G. Wang, "Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detecting foodborne *Salmonella* in raw milk," *Advanced Materials Research*, vol. 647, pp. 577-582, 2013.
- [12] V. R. Masoji, R. J. Zende, R. D. Suryawanshi, V. M. Vaidya, R. N. Waghmare, D. P. Kshirsagar, R. P. Todankar, and A. H. Shirke, "Rapid Detection of *Salmonella* spp. in Animal Origin Foods by In-House Developed Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay," *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 6, no. 4, , pp. 2523-2532, 2017.
- [13] K. Rahn, S. A. De Grandis, R. C. Clarke, S. A. McEwen, J. E. Galan, C. Ginocchio, R. Curtiss, and C. L. Gyles, "Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*," *Molecular and Cellular Probes*, vol. 6, no. 4, pp. 271-279, 1992.
- [14] T. Zhang, C. Wang, X. Wei, X. Zhao, and X. Zhong, "Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of *Staphylococcus aureus* in Dairy Cow Suffering from Mastitis," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 435982, pp. 1-5, 2012.
- [15] M. Ihira, T. Yoshikawa, Y. Enomoto, S. Akimoto, M. Oshahi, S. Suga, N. Nishimura, T. Ozaki, Y. Bishiyama, T. Notomi, Y. Ohta, and Y. Asano, "Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, no. 1, pp. 140-145, 2004.
- [16] S. M. Zhu, J. J. Wu, C. Xu, J. Qu, W. Cheng, and F. S. Chen, "Rapid detection of *Salmonella* spp. by loop-mediated isothermal amplification method," *Mod food science technology*, vol. 24, no. 7, pp. 725-730, 2008.
- [17] Y. Shao, S. Zhu, C. Jin, and F. Chen, "Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 148, no. 2, pp. 75-79, 2011.
- [18] D. M. Tournlousse, F. Ahmad, R. D. Stedtfeld, G. Seyrig, J. M. Tiedje, and S. A. Hashsham, "A polymer microfluidic chip for quantitative detection of multiple water- and foodborne pathogens using real-time fluorogenic loop-mediated isothermal amplification," *Biomed Microdevices*, vol. 14, no. 4, pp. 769-778, 2012.