

## PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG NHANH MỘT SỐ VI SINH VẬT GÂY BỆNH TRONG THỰC PHẨM BẰNG REAL-TIME PCR

Lê Thị Chi, Nguyễn Quốc Bình

Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Chúng tôi đã nghiên cứu và sử dụng Real-Time PCR để phát hiện và định lượng nhanh một số vi sinh vật gây bệnh đường ruột chính ở người trong thực phẩm. Quy trình đã sử dụng một môi trường tăng sinh chung và một chương trình PCR sử dụng trực tiếp dịch tăng sinh với 5 cặp primer đặc hiệu cho 5 loài vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm là *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes* và *Bacillus cereus*. Các primer được chọn đặc hiệu 100% với loài đích và không xảy ra phản ứng chéo với các loài khác. Phương pháp này đơn giản, không cần ly trích, tinh sạch DNA để thực hiện, có độ nhạy cao, phát hiện được từ 1 - 10 bản sao DNA/phản ứng khi được kiểm tra với vi khuẩn thuần. Độ nhạy phát hiện của phương pháp là 1 - 10 CFU/25 g mẫu thực phẩm và sau khi tăng sinh 24 h thì mẫu nhiễm có hàm lượng vi sinh vật từ  $10^7$  -  $10^9$  CFU/ml ( $R^2 = 0,998$ ) kết quả định lượng này không chênh lệch nhiều so với phương pháp đếm khuẩn lạc ( $p = 0,90$ ). Độ chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu cao so với phương pháp truyền thống. Các giá trị trung bình này là 97,99; 98,05 và 95,60%. Toàn bộ quá trình chỉ mất 4 - 30 h so với thời gian 5 - 7 ngày khi sử dụng phương pháp truyền thống.

**Từ khóa:** *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, Real-Time PCR, *Salmonella*, *Shigella*, vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm

### GIỚI THIỆU

Ngộ độc thực phẩm đã và đang là mối đe dọa đối với sức khỏe cộng đồng. Theo thống kê trong những năm gần đây, bình quân hàng năm có khoảng 76 triệu người nhiễm bệnh và 5000 người chết (Mead *et al.*, 1999). Theo thống kê của Trung tâm Kiểm dịch và Phòng bệnh Mỹ (CDC) từ năm 1993 đến năm 1997 xảy ra 2751 vụ ngộ độc thực phẩm ở Mỹ. Nguyên nhân được xác định cao nhất là do vi sinh vật gây nên chiếm từ 75 - 86%. Theo thống kê của Bộ Y tế, trong năm 2008, Việt Nam có 205 vụ ngộ độc thực phẩm làm 2258 trường hợp nhập viện và tập trung chủ yếu ở các khu công nghiệp, khu chế xuất.

Các vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm theo mối quan tâm của cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ (FDA) là: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* và *C. botulinum*.

Việc phát hiện các vi sinh vật theo phương pháp nuôi cấy truyền thống (tăng sinh, phân lập và khẳng định sinh hóa, huyết thanh) vừa tốn kém thời gian (5

- 7 ngày), công sức, tiền của, nguy hiểm và khó khăn cho kỹ thuật viên (Lampel *et al.*, 1990).

Hiện nay, có rất nhiều nghiên cứu ứng dụng PCR truyền thống và PCR cải tiến như Nested PCR và Real-Time PCR để phát hiện nhanh các vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm. Các nghiên cứu này có thể dùng để phát hiện một hay nhiều chủng đích. Phát hiện *Salmonella* trong các loại thực phẩm khác nhau cũng đã được công bố (Waage *et al.*, 1999; Uyttendaele *et al.*, 2003; Malorny *et al.*, 2004; Wolffs *et al.*, 2006; Josefsen *et al.*, 2007; O'Regan *et al.*, 2008), *Shigella* (Lampel *et al.*, 1990; Lindqvist 1999); *L. monocytogenes* (Thomas *et al.*, 1991; Filter *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1992), *B. cereus* (Fricker *et al.*, 2007), hay phát hiện đồng thời một số chủng đích (Wang *et al.*, 1997; Fukushima *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). Nhìn chung, các quy trình để phát hiện các vi sinh vật trong thực phẩm bằng PCR khá khác nhau. Khác nhau về bước chuẩn bị DNA cho phản ứng (DNA khuôn), chương trình PCR, thiết bị PCR và hệ đệm. Hầu hết các nghiên cứu nói trên có độ nhạy phát hiện từ 1 - 10 CFU/g thực phẩm và độ nhạy phản ứng từ 10 bản sao DNA/phản ứng trở lên. Các tiêu chuẩn về an toàn thực phẩm quy định đối với thực phẩm phải không hiện diện một số loài vi khuẩn như *Salmonella*, *Shigella*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 trong 25 g mẫu thì

các phương pháp PCR trên chưa đáp ứng được độ nhạy cần thiết theo phương pháp chuẩn (phương pháp nuôi cấy truyền thống). Vì vậy, cần thiết có một quy trình phát hiện vi sinh vật gây bệnh mới vừa đáp ứng được độ nhạy tương ứng với phương pháp nuôi cấy truyền thống, vừa có độ chính xác cao, đơn giản và có thời gian xét nghiệm nhanh hơn phương pháp nuôi cấy truyền thống.

Dưới đây, nghiên cứu của chúng tôi đưa ra một quy trình Real-Time PCR thông qua một bước nuôi cấy làm giàu cho các vi khuẩn đích và phương pháp xử lý tế bào chung cho 5 loài vi sinh vật gây bệnh phổ biến trong thực phẩm (*E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *L. monocytogenes* và *B. cereus*) nhằm phát hiện và xác định được nồng độ vi sinh vật sau khi làm giàu trong mẫu thực phẩm.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Các chủng vi khuẩn, môi trường và điều kiện nuôi cấy

Các chủng vi khuẩn dùng trong nghiên cứu được

liệt kê theo bảng 1. Một số môi trường sử dụng để chọn ra môi trường làm giàu chung cho 5 chủng vi khuẩn cần phát hiện bao gồm: Buffer peptone water (Oxoid, UK), Luria Bertani ((peptone 10 g/l (Biorad, USA), yeast extract 5 g/l (Biorad, USA), NaCl 5 g/l (Merck, Đức)), Tryptic Soya Broth Yeast Extract ((TSBYE: TSB 30 g/l (Merck, Đức), yeast extract 6 g/l)) và *Listeria* cải biên (Merck, Đức). Một số môi trường agar chọn lọc: Hectoen enteric (HE), Xylose Lysine Desoxycholate citrate (XLD), Desoxycholate citrate (DC), MacConkey, Mannitol Egg York Polymycine (MYP), Oxford Agar và Violet Red Bile Agar (VRB) (Merck, Đức).

Tất cả các chủng đều được nuôi cấy trong điều kiện vi hiếu khí ở 37 °C trong thời gian 20 - 24 h. Riêng đối với chủng *Vibrio* môi trường TSBYE được điều chỉnh pH đến 8,5 và bổ sung muối NaCl đến nồng độ 3%. Tất cả các chủng được bảo quản ở -70°C với nồng độ glycerol 10%.

Môi trường phân lập các chủng đích: HE và XLD (*Salmonella*), DC và MacConkey (*Shigella*), VRB (*E. coli*), MYP (*B. cereus*) và Oxford Agar (*L. monocytogenes*).

**Bảng 1.** Các chủng vi khuẩn sử dụng để kiểm tra độ đặc hiệu các cặp primer.

Tên chủng	Nguồn gốc	Ký hiệu
<i>Salmonella</i> spp.	Trung tâm phân tích TPHCM	Sal s1
<i>Salmonella</i> spp.	Viện Pasteur TPHCM	Sal s2
<i>Salmonella typhimurium</i>	Viện Pasteur TPHCM	SA-106
<i>Shigella</i> spp.	VTCC	Shi 1
<i>Shigella</i> spp.	Viện Pasteur TPHCM (100102)	Shi 2
<i>L. monocytogenes</i>	Viện Pasteur TPHCM	Lis mono
<i>V. parahaemolyticus</i>	Trường Đại học Bách khoa TPHCM	V pa 1
<i>V. parahaemolyticus</i>	Viện Pasteur TPHCM	V pa 2
<i>E. coli</i>	Trường Đại học Bách khoa TPHCM	E coli 1
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	ATCC 25922
<i>B. cereus</i>	Viện Pasteur TPHCM	B cer
<i>Staphylococcus aureus</i>	Viện Pasteur TPHCM	S. au
<i>B. thuringiensis</i>	VTCC BUN	B. thu
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	VTCC B656	B656

### Xử lý tế bào

Các chủng vi khuẩn thuần được nuôi cấy qua đêm trong môi trường TSBYE. Rút 500 µl vào eppendorf 1,5 ml, ly tâm 10000 rpm trong 10 phút,

loại bỏ dịch nổi, bổ sung 50 µl nước cất vô trùng, vortex đều và ly tâm cùng điều kiện như trên thu nhận sinh khối (lặp lại 3 lần). Xử lý tế bào bằng phương pháp đun sôi và phương pháp phân giải kiềm. Đối với phương pháp đun sôi, sinh khối vi

sinh vật sau khi rửa, bổ sung 50 µl nước cất vô trùng, vortex đều trong 2 phút, đun sôi 10 phút và làm lạnh ngay để phá vỡ tế bào, đun sôi lại 5 phút. Đối với phương pháp phân giải kiềm, sinh khối được bổ sung 10 µl nước cất vô trùng, vortex trong 2 phút, sau đó bổ sung 20 µl dung dịch 0,1 N NaOH, vortex trong 2 phút, tiếp theo trung hòa kiềm bằng 20 µl dung dịch 1 M Tris-HCl pH 6,0.

### Primer và chương trình Real-Time PCR

Các gen đích được tham khảo trên GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) và so sánh các gen bằng chương trình clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Primer được thiết kế với chương trình primer3 v 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) và các primer được tổng hợp bởi IDT (USA). 18 cặp primer sử dụng trong nghiên cứu được thiết kế mới 12 cặp và 6 cặp tham khảo từ một số kết quả nghiên cứu trước (Thomas *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1997; Fukushima *et al.*, 2003; Croci *et al.*, 2004). Chương trình Real-Time PCR được tiến hành như sau:

Chu kỳ đầu: 95°C trong 5 phút, 40 chu kỳ tiếp theo: lặp lại các bước: 95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây. Chu kỳ cuối: 72°C trong 5 phút. Khoảng gia nhiệt  $\Delta t = 0,5^\circ\text{C}$ .

Phản ứng Real-Time PCR được thực hiện với máy Cyclor iQ<sup>TM</sup>5 (BioRad, USA) trong một hỗn hợp có tổng thể tích 25 µl bao gồm: nước cất vô trùng 10,5 µl, MasterMix 2X (Fermentas, Canada) 12,5 µl, primer 10 µM riêng cho từng chủng 1 µl và DNA khuôn 1 µl.

### Kiểm tra độ đặc hiệu của primer

Các cặp primer được kiểm tra với các chủng thuần theo chương trình Real-Time PCR nói trên. Kết quả phản ứng được điện di trên gel 1,2% agarose nhuộm với ethium bromide (50 µg/ml) 20 phút, hiện màu với UV bằng thiết bị Gel Doc (BioRad, USA).

### Kiểm tra độ nhạy của phản ứng Real-Time PCR

Các chủng thuần được nuôi cấy qua đêm trong môi trường TSBYE, kiểm tra nồng độ tế bào trên môi trường chọn lọc tương ứng (*Salmonella*/HE, *Shigella*/MacConkey, *Listeria monocytogenes*/Oxford Agar, *E. coli*/VRB, *B. cereus*/MYP). Xử lý tế bào bằng phương pháp đun sôi và phương pháp phân giải kiềm như đã miêu tả. Các dung dịch sau khi đã xử lý được pha loãng đến  $10^4$ ;  $10^3$ ;  $10^2$ ;  $10^1$  và  $10^0$  bản sao DNA/µl (xem 1 tế bào tương đương 1 bản sao DNA) và sử dụng làm DNA khuôn.

### Độ nhạy phát hiện trong mẫu thực phẩm

Để kiểm tra khả năng phát hiện các vi khuẩn hiện diện trong mẫu thực phẩm, tiến hành các thí nghiệm nhiễm nhân tạo trên một số cơ chất thực phẩm (bún tươi, chả lụa, nghêu và thịt băm). Các mẫu thực phẩm được chuẩn bị bằng cách cân 25 g mẫu vào túi nilong (20 × 30 cm) có vải lọc, bổ sung thêm 225 ml TSBYE. Tất cả được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút. Sau khi hấp để nguội hoàn toàn. Một dung dịch vi khuẩn thuần biết trước nồng độ bổ sung vào mẫu thực phẩm vô khuẩn, đồng nhất mẫu bằng máy đập mẫu (stomacher 400, UK) trong 2 phút. Đem ủ ở 37°C trong thời gian 20 - 24 h. Lấy 1 ml dịch tăng sinh lý tâm ở 2000 rpm/3 phút, hút 500 µl dịch nổi để tiến hành xử lý tế bào theo hai phương pháp được mô tả. Đồng thời với xử lý tế bào cho phương pháp phân tích Real-Time PCR, tiến hành kiểm tra nồng độ tế bào vi khuẩn trong mẫu bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa đối với từng chủng vi khuẩn trên môi trường chọn lọc tương ứng với từng chủng đích.

### Chuẩn bị mẫu xây dựng đường chuẩn

Đường chuẩn xây dựng từ 4 phản ứng có hàm lượng tế bào được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Hàm lượng DNA trong 4 mẫu chuẩn có hàm lượng tương ứng là  $10^5$ ;  $10^4$ ;  $10^3$ ;  $10^2$  bản sao DNA/µl.

### Chuẩn bị mẫu thực phẩm

Mười ba mẫu thực phẩm bao gồm 9 mẫu hải sản và 4 mẫu sữa tươi được thu thập ngẫu nhiên tại siêu thị Big C miền Đông (Tô Hiến Thành, thành phố Hồ Chí Minh), các mẫu được trữ lạnh ở 4°C trong 1 ngày. Chuẩn bị mẫu cho kiểm tra các vi khuẩn đích bằng Real-Time PCR như sau: 25 g (ml) + 225 ml TSBYE, tăng sinh trong 24 h ở 37°C. Song song với bước chuẩn bị để phân tích bằng Real-Time PCR, chuẩn bị mẫu cho phân tích bằng phương pháp truyền thống (FDA, 1998). Khi kiểm tra bằng phương pháp truyền thống chúng tôi lựa chọn một số khuẩn lạc đặc trưng khẳng định bằng PCR thay vì khẳng định bằng các phản ứng sinh hóa và huyết thanh.

Tế bào được xử lý bằng theo phương pháp đun sôi.

**Tính toán độ chính xác, độ đặc hiệu và độ nhạy của phương pháp Real-Time PCR** (O'Regan *et al.*, 2008)

$$\text{Độ chính xác (AC): } AC = \frac{PA + NA}{N} \times 100\%$$

Độ đặc hiệu (SP):  $SP = \frac{NA}{N^-} \times 100\%$

Độ nhạy (SE):  $SE = \frac{PA}{N^+} \times 100\%$

Trong đó:

PA: số mẫu cho kết quả dương ở cả hai phương pháp (Real-Time PCR và truyền thống);

NA: Số mẫu cho kết quả âm tính ở cả hai phương pháp (Real-Time PCR và truyền thống);

N: Tổng số mẫu phân tích;

PD: Số mẫu cho kết quả dương tính giả ở Real-Time PCR;

ND: Số mẫu cho kết quả âm tính giả với phương pháp Real-Time PCR;

pháp Real-Time PCR;

$N^-$ : NA + PD;

$N^+$ : ND + PA.

### KẾT QUẢ

#### Kiểm tra độ đặc hiệu của các primer

Từ 18 cặp primer chọn được 5 cặp primer đặc hiệu cho 5 loài đích (Bảng 2; 4 và Hình 1) bao gồm primer ial cho *Shigella*, primer invA cho *Salmonella*, primer BC cho *B. cereus*, primer LL cho *L. monocytogenes* và primer eae2 cho *E. coli*. Tất cả 5 cặp primer này không cho phản ứng chéo với các loài khác. Sản phẩm sau khi PCR được điện di trên gel 1,2% agarose (kết quả không trình bày ở đây).

**Bảng 2.** Trình tự các primer đặc hiệu.

Primer và trình tự (5' - 3')	Gen đích/protein	Tham khảo
invA 139, GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA	invA	Fukushima <i>et al.</i> , 2003
invA 141, TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		
ial-F, GCTGTACTTTTCGGTGGGAAGC	ial	Nghiên cứu này
ial-R, ACGTCATGCCAGCTATTTC		
eae2-F, CACCACCACCATCACCATTA	eae2	Nghiên cứu này
eae2-R, ATGTACCGCCGAACCTCAAC		
LL5, AACCTATCCAGGTGCTC	hlyA	Thomas <i>et al.</i> , 1991
LL6, CTGTAAGCCATTCGTC		
BC-1, CTGTTAGCGAATCGTAC	hemolysine	Wang <i>et al.</i> , 1997
BC-2, TACTGCTCCAGCCACATTAC		

**Bảng 3.** So sánh khả năng tăng trưởng của các loài vi khuẩn trên một số môi trường tiên tăng sinh.

Các chủng	Môi trường			
	BPW	LB	TSBYE	Listeria cải biên
<i>Salmonella</i>	1,00	1,17	28,04	Không kiểm tra
<i>Shigella</i>	0,45	0,65	1,00	Không kiểm tra
<i>L. monocytogenes</i>	0,12	1,49	2,38	1,00
<i>E. coli</i>	1,00 <sup>a</sup>	1,08	58,11	Không kiểm tra
<i>B. cereus</i>	1,00 <sup>a</sup>	0,97	0,89	Không kiểm tra

**Ghi chú:** <sup>a</sup>: không có trong quy trình FDA's BAM.

**Bảng 4.** Kết quả kiểm tra các primer đặc hiệu.

Chủng VSV	Primer				
	invA	lal	LL	eae2	BC
Sal s1	+	-	-	-	-
Sal s2	+	-	-	-	-
SA-106	+	-	-	-	-
Shi 1	-	+	-	-	-
Shi 2	-	+	-	-	-
Lis mono	-	-	+	-	-
V pa 1	-	-	-	-	-
V pa 2	-	-	-	-	-
E coli 1	-	-	-	+	-
ATCC 25922	-	-	-	+	-
B cer	-	-	-	-	+
S. au	-	-	-	-	-
B. thu	-	-	-	-	-
B656	-	-	-	-	-
Kích thước sản phẩm (bp)	284	107	267	185	251
Tm (°C)	82,3 ± 0,7	78,5 ± 0,4	74,5 ± 0,7	80,6 ± 0,5	77,0 ± 0,4

**Ghi chú:** +: Dương tính; -: Âm tính; Tm: được tính trung bình từ 20 - 25 phản ứng.

### Môi trường tăng sinh chung cho các chủng vi sinh vật

Bốn loại môi trường dùng để kiểm tra sự tăng trưởng của các chủng *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *B. cereus* và *L. monocytogenes*. Nếu quy định môi trường tiền tăng sinh quy trình FDA's BAM (ngoại trừ *E. coli* và *B. cereus* tự quy ước) cho từng chủng vi khuẩn là 1,00 thì kết quả kiểm tra các môi trường được thể hiện trong bảng 3, cho thấy rằng môi trường TSBYE là môi trường mà các vi khuẩn đích tăng sinh tốt nhất.

Từ kết quả này chúng tôi đã sử dụng môi trường TSBYE để làm giàu chung cho các vi khuẩn đích.

### Độ nhạy phản ứng Real-Time PCR

Độ nhạy phản ứng Real-Time PCR của các cặp primer được kiểm tra trong dung dịch chứa DNA từ vi khuẩn thuần, có khả năng phát hiện khi sự hiện diện của dưới 10 bản sao DNA /mỗi phản ứng.

### Độ nhạy phát hiện

Tất cả các mẫu thực phẩm được gây nhiễm (35 mẫu/ chủng đích) sau khi tăng sinh 20 - 24 h đều cho

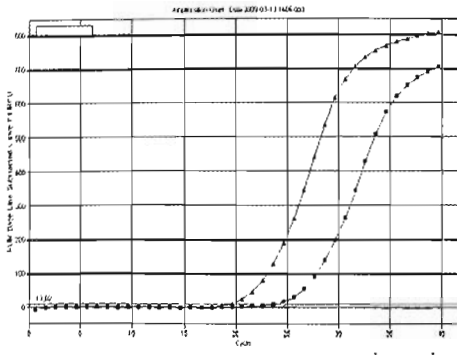
kết quả dương tính khi sử dụng phương pháp nuôi cấy truyền thống và phương pháp Real-Time PCR tế bào xử lý bằng cách đun sôi và kết quả định lượng giữa 2 phương pháp này không đáng kể ( $p = 0,90$ ). Trong khi đó với phương pháp Real-Time PCR tế bào xử lý bằng kiểm thì có 14/175 mẫu cho kết quả âm tính và kết quả định lượng dao động từ  $10^4 - 10^{10}$  bản sao DNA/ml.

Các giá trị AC, SE, SP được tính toán từ 30 - 40 mẫu nhiễm nhân tạo, trung bình 97,99; 98,05 và 95,6% (khi sử dụng phương pháp đun sôi) và 86,44; 89,97 và 89,33% (khi sử dụng phương pháp phân giải kiềm)

Do vậy khi tiến hành phân tích hiện trạng nhiễm khuẩn của thực phẩm, chúng tôi sử dụng phương pháp đun sôi để xử lý mẫu.

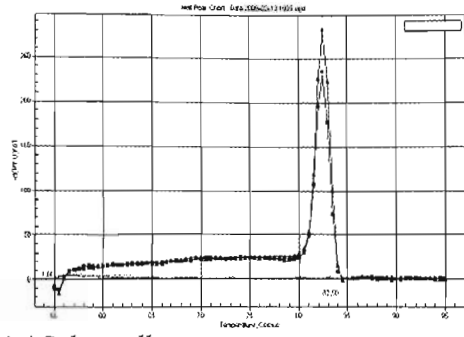
### Kiểm tra mẫu thực phẩm

Không có mẫu nào phát hiện *Listeria monocytogenes*. Các mẫu bị nhiễm vi sinh vật đích sau khi tăng sinh, kết quả định lượng dao động từ  $10^7 - 10^{10}$  bản sao DNA/ml. Toàn bộ kết quả phân tích thể hiện trong bảng 5 và hình 2.

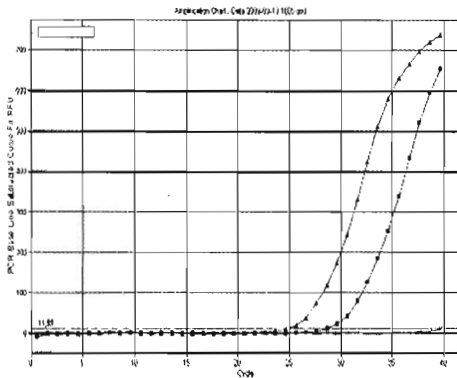


**A**

primer *invA* / *Salmonella*

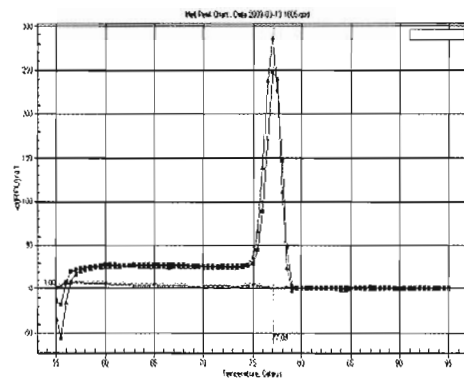


**B**

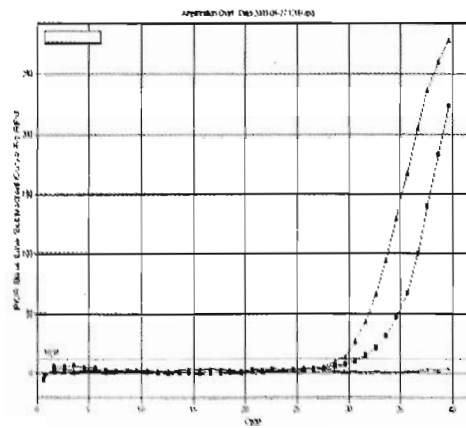


**A**

primer *BC* / *Bacillus cereus*

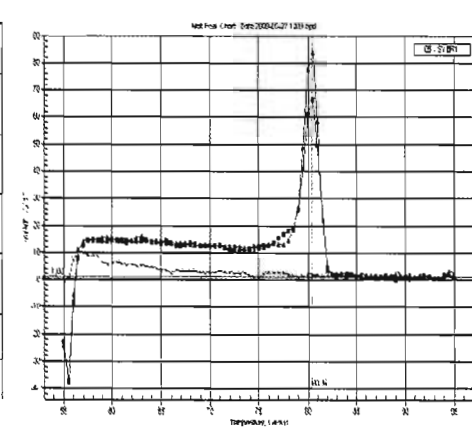


**B**

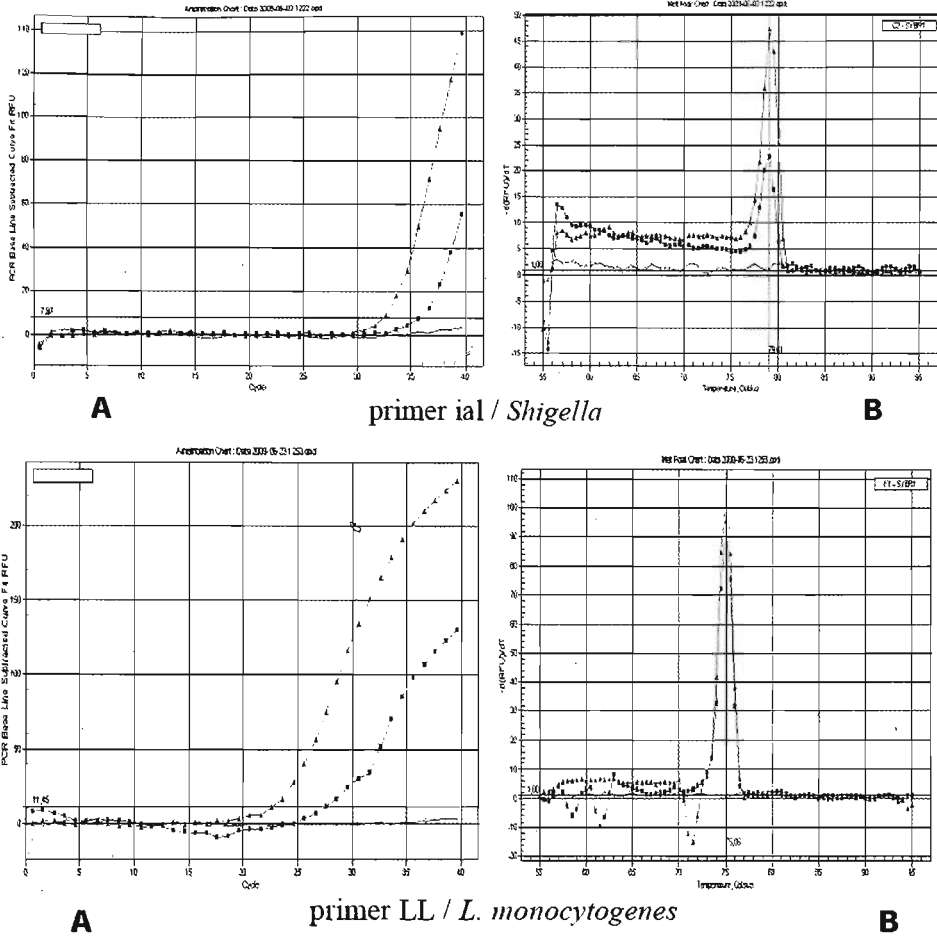


**A**

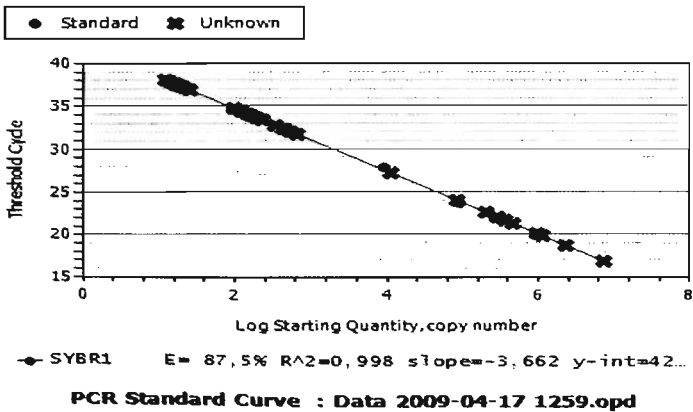
primer *eae2* / *E. coli*



**B**



Hình 1. Phân tích kết quả Real-Time PCR với các cặp primer đặc hiệu tương ứng với chủng đích. A. Biểu diễn chu kỳ phát hiện (Ct); B. Biểu diễn giá trị Tm của sản phẩm PCR.



Hình 2. Đường chuẩn để định lượng bản sao DNA trong phân tích bằng Real-Time PCR.

**Bảng 5.** Phân tích hiện trạng nhiễm khuẩn của thực phẩm sau khi làm giàu bằng Real-Time PCR và bằng phương pháp truyền thống.

Mẫu thực phẩm	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
Tôm thẻ	-/-	8,6.10 <sup>7</sup> /+	-/-	-/+	-/+
Sò lụa	4,88.10 <sup>7</sup> /+	2,75.10 <sup>9</sup> /+	-/-	-/-	1,35.10 <sup>10</sup> /+
Cá viên basa	-/-	1,75.10 <sup>10</sup> /+	-/-	2,26.10 <sup>9</sup> /+	2,26.10 <sup>8</sup> /+
Mực ống nguyên con	-/-	4,04.10 <sup>7</sup> /+	-/-	9,86.10 <sup>8</sup> /+	8,22.10 <sup>7</sup> /+
Mực ống cắt khoanh	-/-	-/+	-/-	3,74.10 <sup>9</sup> /+	3,45.10 <sup>8</sup> /+
Nghêu lụa đông lạnh	-/-	8,85.10 <sup>9</sup> /+	-/-	6,35.10 <sup>8</sup> /+	1,14.10 <sup>10</sup> /+
Sữa tươi hương dâu	-/-	-/-	-/-	2,44.10 <sup>10</sup> /+	2,84.10 <sup>7</sup> /+
Sữa tươi không đường	-/-	1,09.10 <sup>7</sup> /+	-/-	1,93.10 <sup>9</sup> /+	7,86.10 <sup>8</sup> /+
Sò lông luộc	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+
Đầu mực	-/-	-/+	-/-	4,70.10 <sup>8</sup> /+	2,45.10 <sup>7</sup> /+
Cò sò điệp	-/-	1,43.10 <sup>9</sup> /+	-/-	3,52.10 <sup>8</sup> /-	1,97.10 <sup>8</sup> /+
Sữa tươi có đường	-/-	-/-	-/-	2,08.10 <sup>9</sup> /+	-/-
Sữa đậu nành	-/-	-/-	-/-	1,37.10 <sup>9</sup> /+	-/-

**Ghi chú:** /- hay /+: Kết quả phân tích bằng phương pháp truyền thống (/ -: Âm tính, /+: Dương tính).

## THẢO LUẬN

Thực phẩm, khi bị nhiễm vi sinh vật, nó có thể bị nhiễm nhiều loài vi sinh vật khác nhau và ở mật độ thấp, không như đối với mẫu bệnh phẩm. Do vậy, hầu hết các nghiên cứu để phát hiện vi sinh vật trong thực phẩm đều có giai đoạn tăng sinh trên môi trường không chọn lọc để khôi phục các tế bào bị tổn thương trong quá trình chế biến và bảo quản, mỗi loài được tăng sinh trên môi trường khác nhau. Điều này vừa làm mất thời gian và công sức chuẩn bị mẫu cho phân tích. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm từ 4 loại môi trường riêng biệt BPW, TSBYE, LB và *Listeria* cải biên để chọn ra một môi trường tăng sinh chung cho 5 loài vi khuẩn cần phát hiện là TSBYE. Môi trường này cũng đã được sử dụng trong nghiên cứu trước (Wang *et al.*, 1997; 2007). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế thành công hai cặp primer mới cho *E. coli* và *Shigella* dựa trên hai đoạn gen *eaeA* của *E. coli* và *ial* (một locus trên plasmide xâm nhiễm) của *Shigella*. Chúng tôi đã sử dụng hai phương pháp phá vỡ tế bào là phương pháp đun sôi và phương pháp phân giải kiềm để chọn ra phương pháp chuẩn bị DNA tối ưu cho phản ứng. Đối với mẫu vi khuẩn

thuần, kết quả định lượng của Real-Time PCR với tế bào vi khuẩn phá vỡ bằng phương pháp đun sôi và phương pháp phân giải kiềm không chênh lệch so với phương pháp đếm khuẩn lạc ( $p = 0,90$ ). Trong khi các phân tích Real-Time PCR đối với vi khuẩn từ mẫu thực phẩm thì DNA khuôn từ phương pháp đun sôi cho kết quả định tính và định lượng không chênh lệch nhiều so với phương pháp truyền thống nhưng DNA khuôn từ phương pháp phân giải kiềm ít ổn định hơn so với phương pháp truyền thống. Kết quả này cho thấy khi sử dụng phương pháp phân giải kiềm để phá vỡ tế bào vi khuẩn trong thực phẩm gây ức chế phản ứng PCR vì sự hiện diện của hỗn hợp các chất phức tạp trong thực phẩm, khi xử lý bằng NaOH có thể tạo ra một số chất mới ức chế phản ứng, còn đối với phương pháp đun sôi khả năng hình thành các chất mới sau khi xử lý thấp. Do vậy, DNA khuôn cho phản ứng Real-Time PCR từ dịch tế bào xử lý bằng phương pháp đun sôi cho kết quả ổn định hơn phương pháp phân giải kiềm. Nên chúng tôi đã sử dụng phương pháp đun sôi để xử lý tế bào vi khuẩn trong mẫu thực phẩm. Phương pháp chuẩn bị DNA khuôn được chọn vừa đơn giản trong thao tác, vừa ít tốn kém so với một số phương pháp ly trích DNA khác như sử dụng proteinase K, kit ly trích



DNA (Fukushima *et al.*, 2003). Chúng tôi sử dụng thí nghiệm gây nhiễm nhân tạo để so sánh hai phương pháp xử lý tế bào vì chúng gây nhiễm là chủng thuần, có thể xác định nồng độ tế bào trong mẫu sau gây nhiễm bằng phương pháp đếm khuẩn lạc.

Một số nghiên cứu trước đây phát hiện đồng thời hai hay nhiều chủng đích trong cùng 1 phản ứng, có độ nhạy  $10^5$  tế bào/g (Fukushima *et al.*, 2003), phát hiện đồng thời *E. coli* O157:H7, *Salmonella* và *Shigella* bằng multiplex Real-Time PCR có độ nhạy phản ứng từ 10 - 100 tế bào/phản ứng và có khả năng phát hiện đối với *E. coli* O157: H7, *Salmonella*, *Shigella* lần lượt là  $10^5$ ,  $10^3$  và  $10^4$  tế bào/g (Wang *et al.*, 2007), hay phát hiện đồng thời *L. monocytogenes* và *E. coli* O157:H7 có độ nhạy phát hiện tương ứng là 1 - 6 và 1 - 3 tế bào/g thịt bò sau khi tăng sinh 30 h trên môi trường BHI (Nguyen *et al.*, 2004),  $5.10^5$  tế bào *Shigella*/phản ứng (Wang *et al.*, 1997), 10 CFU/g (thực phẩm hay phân) *E. coli* và *Salmonella* sau khi tăng sinh 18 h trên môi trường GNTSB (môi trường Gram Negative + TSB) (Sharma *et al.*, 2000). Một số nghiên cứu dùng PCR đối với từng chủng đích có khả năng phát hiện từ 1 - 10 tế bào/g (Lindqvist, 1999; Eyigor *et al.*, 2002; Croci *et al.*, 2004; Josefsen *et al.*, 2007), 10 - 100 CFU/g (Filter *et al.*, 1992), 1 - 10 tế bào/25 g mẫu nhưng phải qua 24 - 48 h tăng sinh trên BPW (Uyttendaele *et al.*, 2003; O'Regan *et al.*, 2008), 5 - 50 tế bào/25 g (Wang *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 2004). Độ nhạy của phản ứng từ 1 - 10 tế bào/phản ứng (Lindqvist, 1999; Uyttendaele *et al.*, 2003; De Medici *et al.*, 2003; Wolffs *et al.*, 2006), 5 - 50 tế bào/phản ứng (Malorny *et al.*, 2004), 50 - 500 tế bào/phản ứng (Filter *et al.*, 1992),  $10 - 10^4$  tế bào/phản ứng (Lampel *et al.*, 1990). Nhìn chung các nghiên cứu trước đây khi phát hiện đồng thời các chủng trong cùng 1 phản ứng tuy nhanh nhưng có độ nhạy thấp và khả năng phát hiện trong thực phẩm chưa cao so với phương pháp truyền thống, trong khi đó các phân tích PCR cho từng chủng riêng lẻ có khả năng phát hiện sự hiện diện của chủng vi khuẩn đích cao (Uyttendaele *et al.*, 2003; O'Regan *et al.*, 2008), nhưng để phát hiện mỗi chủng đích phải sử dụng một môi trường tăng sinh khác nhau và sản phẩm được phân tích trong bước hậu PCR bằng phương pháp điện di hay lai DNA, điều này dễ xảy ra hiện tượng lây nhiễm chéo, cho kết quả dương tính giả. Tổng hợp một số ưu điểm của các nghiên cứu của các tác giả trước đây chúng tôi đã nghiên cứu và đưa ra một quy trình để phát hiện nhanh, đủ độ nhạy, đơn giản và tiết kiệm được thời gian chuẩn bị DNA cho phân tích và

kết quả phân tích trung thực hơn các phương pháp PCR thường. Vì mỗi chủng đích được phân tích trong mỗi phản ứng khác nhau, do vậy phương pháp chúng tôi có độ nhạy cao từ 1 - 10 tế bào/phản ứng và có khả năng phát hiện và định lượng hiện diện của vi sinh vật đích từ 1 - 10 tế bào/25 g mẫu thực phẩm sau khi tăng sinh, kết quả được phân tích ngay trong quá trình phản ứng nên kết quả phân tích trung thực hơn phương pháp PCR thường. Độ chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp chúng tôi đưa ra so với phương pháp truyền thống cao, các giá trị tương ứng 97,99; 98,05 và 95,6%.

Mặt khác, trong những trường hợp ngộ độc thực phẩm khi tiêu thụ những thực phẩm đã qua nấu chín mà với phương pháp phân tích truyền thống không thể xác định được nguyên nhân thì phương pháp Real-Time PCR hoàn toàn có thể vì phương pháp dựa trên phân tích DNA.

Với phương pháp chúng tôi đưa ra, nếu phân tích mẫu bệnh phẩm có nồng độ vi sinh vật ban đầu cao có thể phân tích trực tiếp từ mẫu mà không trải qua giai đoạn tăng sinh, kết quả phân tích chỉ trong khoảng 4 h.

## KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu này, chúng tôi kết luận rằng phương pháp Real-Time PCR với DNA khuôn sử dụng trong phân tích từ tế bào được xử lý bằng phương pháp đun sôi do chúng tôi xây dựng nên hoàn toàn có thể thay thế phương pháp nuôi cấy cổ điển để định tính và định lượng vi sinh vật gây bệnh trong mẫu thực phẩm trên phương diện độ nhạy và độ chính xác. Mặt khác, phương pháp của chúng tôi có thời gian thực hiện ngắn hơn nhiều (4 - 30 h so với 5 - 7 ngày) và thao tác đơn giản hơn. Phương pháp này nên được ứng dụng cho các trung tâm phân tích về việc đánh giá an toàn vệ sinh thực phẩm, đặc biệt hữu ích trong các trường hợp chẩn đoán nhanh các ca ngộ độc thực phẩm.

**Lời cảm ơn:** Nhóm nghiên cứu của chúng tôi xin chân thành cảm ơn Trung tâm phân tích thí nghiệm Thành phố Hồ Chí Minh, trường Đại học Bách khoa Thành phố Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ chúng tôi trong nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cheung PY, Chan CW, Wong W, Cheung TL, Kam KM (2004) Evaluation of two real time polymerase chain

- reaction pathogen detection kits for *Salmonella* spp. in food. *Lett Appl Microbiol* 39: 509-515.
- Croci L, Delibato E, Volpe G, De Medici D, Palleschi G (2004) Comparison of PCR, Electrochemical Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, and the Standard Culture Method for detecting *Salmonella* in meat products. *Appl Environ Microbiol* 70: 1393-1396.
- De Medici D, Croci L, Delibato E, Di Pasquale S, Filetici E, Toti L (2003) Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I Real-Time PCR to detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in poultry. *Appl Environ Microbiol* 69: 3456-3461.
- Eyigor A, Carli KT, Unal CB (2002) Implementation of Real-Time PCR to tetrathionate broth enrichment step of *Salmonella* detection in poultry. *Lett Appl Microbiol* 34: 37-41.
- FDA (1998) FDA's Bacteriological Analytical Manual (BAM), 8<sup>th</sup> ed.
- Filter S, Heuzenroede M, Thomas CJ (1992) A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol* 73: 53-59.
- Fricker M, Messelhäuser U, Busch U, Scherer S, Ehling-Schulz M (2007) Diagnostic Real-Time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent foodborne outbreaks. *Appl Environ Microbiol* 73: 1892-1898.
- Fukushima H, Tsunomori Y, Seki R (2003) Duplex Real-Time SYBR Green PCR assays for detection of 17 Species of food- or waterborne pathogens in stools. *J Clin Microbiol* 41: 5134-5146.
- Josefsen MH, Krause M, Hansen F, Hoorfar J (2007) Optimization of a 12-hour TaqMan PCR-based method for detection of bacteria in meat. *Appl Environ Microbiol* 73: 3040-3048.
- Lampel KA, Jagow JA, Trucess M, Hill WE (1990) Polymerase Chain Reaction for detection of invasive *Shigella flexneri* in food. *Appl Environ Microbiol* 56: 1536-1540.
- Lindqvist R (1999) Detection of *Shigella* spp. in food with a nested PCR method sensitivity and performance compared with a conventional culture method. *J Appl Microbiol* 86: 971-978.
- Malomy B, Paccassoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, Helmuth R (2004) Diagnostic Real-Time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl Environ Microbiol* 70: 7046-7052.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV (1999) Food-related illness and death in the United States. *J Emerg Infect Dis* 5: 607-625.
- O'Regan E, McCabe E, Burgess C, McGuinness S, Barry T, Duffy G, Whyte P, Fanning S (2008) Development of a real time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiol* 8: 156.
- Sharma VK, Calson SA (2000) Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 with Fluorogenic PCR and single-enrichment-broth culture. *Appl Environ Microbiol* 66: 5472-5477.
- Thomas EJ, King RK, Burchark J, Gannon VP (1991) Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the Polymerase Chain Reaction. *Appl Environ Microbiol* 57: 2576-2580.
- Uyttendaele M, Vanwildemeersch K, Debevere J (2003) Evaluation of Real-Time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Lett Appl Microbiol* 37: 386-391.
- Waage AS, Vardund TLV, Kapperud G (1999) Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. *J Appl Microbiol* 87: 418-428.
- Wang L, Li Y, Mustaphai A (2007) Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in ground beef by multiplex Real-Time PCR and immunomagnetic separation. *J Food Prot* 70: 1366-1372.
- Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE (1997) A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J Appl Microbiol* 83: 727-736.
- Wang RF, Cao WW, Johnson MG (1992) 16S rRNA-Based probes and Polymerase Chain Reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. *Appl Environ Microbiol* 58: 2827-2831.
- Wolffs PF, Glencross K, Thibaudeau R, Griffiths MS (2006) Direct quantitation and detection of *Salmonellae* in biological samples without enrichment, using two-step filtration and real-time-PCR. *Appl Environ Microbiol* 72: 3896-3900.

## RAPID DETECTION AND QUANTIFICATION OF THE FOODBORNE PATHOGENES BY REAL-TIME PCR

Le Thi Chi, Nguyen Quoc Binh\*

Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

### SUMMARY

We developed and assessed Real-Time PCR method for the rapid detection and quantification of infected in foodstuff pathogens, which are major bacteria in the intestinal tracts of human. The protocol used a universal culture preenrichment medium and PCR program that used direct enrichment culture broth with 5 sets of specific primers for 5 species of foodborne pathogens were *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. The primers 100% specific as determined target species and no interference reaction with non-target species was observed. This method was simple that unnecessary DNA extraction, purification and had highly sensitive, detection limits from 1 to 10 copies/reaction as pure bacteria and 1 - 10 CFU/25 g food. After enrichment in TSBYE medium in 24 hours, samples infected microbial were determined the amount of cells from  $10^7$  to  $10^9$  cells/ml ( $R^2 = 0.998$ ) and the same colony counting method ( $p = 0.90$ ). The accuracy, sensitivity and specificity is high, these average values are 97.99, 98.05, and 95,60%. All the time to finish diagnosis only spent 4 - 30 hours in comparison with 5 - 7 days when using conventional culture method.

**Keywords:** *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, Real-Time PCR, *Salmonella*, *Shigella*, infected in foodstuff pathogens

---

\* Author for correspondence: Tel: 84-8-38222481; E-mail: [binhng@hcmbiotech.com.vn](mailto:binhng@hcmbiotech.com.vn)