

PHÁT HIỆN NHANH *SALMONELLA SPP.*, *SALMONELLA ENTERICA* HIỆN DIỆN TRONG THỰC PHẨM BẰNG KỸ THUẬT PCR ĐA MŨI (MULTIPLEX PCR)

Trần Thị Xuân Mai¹, Võ Thị Thanh Phương², Trần Thị Hoàng Yến³ và Nguyễn Văn Bé⁴

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a polymerase chain reaction protocol using two specific primer sets for the detection of *Salmonella enteritica* in food products. The results showed that the *invA* primer set was specific for *Salmonella spp.* and the *spvC* primer set was specific for *Salmonella enteritica* including *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. A multiplex PCR using two sets of primers to amplify the tagged genes of *invA* and *spvC* was successfully developed. A total of 260 specimens of food products collected from different markets in Cantho city were examined for *Salmonella*, the results showed that 20% of fermented pork roll samples, 47.5% of pork samples, 30% of beef samples, 46.7% of chicken meat samples, 40% of egg shell samples, 10% of egg samples (egg white and egg yolk), 0% of fermented crab samples, 40% of red ark shell samples, and 20% of pork skin products were contaminated with *Salmonella spp.* In addition, 2.5% of pork samples, 2.5% of beef samples, 1.6% of chicken meat samples, 10% of egg shell samples and 5% of blood cockle samples were contaminated with *Salmonella enteritica*.

Keywords: *invA* gene, *spvC* gene, multiplex-PCR, *Salmonella enteritica*

Title: Rapid detection of *Salmonella spp.*, *Salmonella enteritica* in food products by using multiplex PCR technique

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm phát triển qui trình PCR sử dụng hai cặp mồi chuyên biệt để phát hiện *Salmonella enteritica* trong thực phẩm. Kết quả nghiên cứu cho thấy cặp mồi *invA* đặc hiệu cho *Salmonella spp.*, và cặp mồi *spvC* đặc hiệu cho *Salmonella enteritica* bao gồm *Salmonella typhimurium* và *Salmonella enteritidis*. Kỹ thuật PCR đa mồi để khuếch đại các gen mục tiêu *invA* và *spvC* đã được phát triển thành công. Trong tổng số 260 mẫu thực phẩm được thu thập từ các chợ khác nhau trong địa bàn thành phố Cần Thơ để kiểm tra về sự hiện diện của *Salmonella*. Kết quả cho thấy tỉ lệ mẫu thực phẩm bị nhiễm *Salmonella spp.* là nem chua (20%), thịt heo (47,5%), thịt bò (30%), thịt gà (46,7%), trứng gà (lòng trắng và lòng đỏ) (10%), vỏ trứng gà (40%), chả lụa (10%), ba khía (0%), sò huyết (40%), bì heo (20%). Trong đó, 2,5% ở thịt heo, 2,5% ở thịt bò, 1,6% ở thịt gà, 10% ở vỏ trứng gà và 5% ở sò huyết phát hiện nhiễm *Salmonella enteritica*.

Từ khóa: gen *invA*, gen *spvC*, PCR đa thành phần, *Salmonella enteritica*

1 MỞ ĐẦU

Salmonella enterica là vi khuẩn Gram âm, hình que, sống kỵ khí không bắt buộc, phần lớn gây bệnh ở người và động vật. Hiện nay có hơn 2.500 kiểu huyết thanh

¹ Viện NC&PT Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ

³ Viện CNSH, Trường Đại học Cần Thơ

⁴ Phòng hợp tác quốc tế, Trường Đại học Cần Thơ

của *S. enterica* trong đó *S. typhimurium* và *S. enteritidis* là hai kiểu huyết thanh quan trọng gây bệnh cho người (Baay, Huis in't Veld, 1993; Tan, Shelef, 1999). Theo ước tính có 75% trường hợp ở người mắc phải bệnh do *Salmonella* là do ăn phải những thức ăn bị nhiễm khuẩn bao gồm thịt bò, thịt heo, thịt gia cầm và trứng (Kent *et al.*, 1981). Thống kê từ 1990 đến 1995, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* chiếm khoảng 70% tổng số *Salmonella* được phân lập trên toàn thế giới (Herikstad, Tauxe, 2002).

Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN: 7926-2008 Thịt và sản phẩm của thịt và TCVN 6040: 2007 Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn gia súc) yêu cầu lượng *Salmonella* trong 25 g thực phẩm là 0.

Sự xâm nhiễm và gây độc của *S. enterica* từ thực phẩm chưa nấu chín vào tế bào biểu mô ruột của người và động vật có vú liên quan đến các gen nằm trên nhiễm sắc thể và plasmid. Tất cả các *Salmonella* đều mang cụm gen invABC nằm trong hệ thống gen SPI - 1 (*Salmonella* pathogenicity island) có mặt trong tất cả các *Salmonella* nhưng không hiện diện ở *Escherichia coli* (Galan, 1991) và các vi sinh vật khác. Locus invA nằm ở vị trí 59 phút trên nhiễm sắc thể của *Salmonella* và trình tự nucleotid của gen invA mã hóa cho chuỗi polypeptid chứa 686 acid amin. (Galan *et al.*, 1992). Một operon spv (*Salmonella* plasmid virulence) chứa 5 gen spvRABCD hiện diện trong plasmid (Libby *et al.*, 2000). Gen spvR mã hoá protein điều hoà sự biểu hiện của operon spvABCD. Các gen spv biểu hiện khi *Salmonella* đã xâm nhiễm vào bên trong tế bào vật chủ, làm tăng tính độc của *Salmonella*, giúp vi khuẩn xâm nhiễm và tồn tại bên ngoài ruột như gan, tụy ... (Oliveira *et al.*, 2003). Theo Gulig *et al.* (1993) và Lin *et al.* (2007) chỉ có 7 kiểu huyết thanh của *S. enterica* là *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. abortusovis*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. gallinarum-pullorum* và *S. sendai* gây bệnh đường ruột là có operon spv(RABCD).

Đánh giá chất lượng và an toàn thực phẩm là những tiêu chuẩn rất quan trọng trong bảo vệ sức khỏe con người. Vì vậy mà hiện nay đã có nhiều phương pháp được sử dụng để phát hiện vi khuẩn *Salmonella*, phương pháp nuôi cấy truyền thống luôn luôn bao gồm nhiều công đoạn nuôi cấy kết hợp với các bước kiểm tra làm mất nhiều thời gian từ 5 đến 7 ngày (ISO 6579:2003).

Những tiến bộ của các kỹ thuật sinh học phân tử đã và đang cho phép phát triển những phương pháp kiểm tra rất nhạy và nhanh sự hiện diện của các đồng vi khuẩn mà không cần đến giai đoạn nuôi cấy tách rỗng. Kỹ thuật phản ứng chuỗi polymerase (Polymerase chain reaction PCR) là một kỹ thuật dùng để khuếch đại các đoạn DNA chuyên biệt bằng cách sử dụng các cặp mồi chuyên biệt. PCR có thể được sử dụng để phát hiện một lượng rất nhỏ của DNA mục tiêu đã bị pha lẫn trong các mẫu DNA khác nhau. Nhiều kỹ thuật PCR được sử dụng để phát hiện *Salmonella* như PCR sử dụng một cặp mồi hoặc PCR đa mồi sử dụng phối hợp hai cặp mồi (Chiu and Ou, 1996; Gentry-Weeks *et al.*, 2002), ba cặp mồi (Kumar, 2006) hoặc bốn cặp mồi (Zahraei Salehi *et al.*, 2007).

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm phát triển một phương pháp phát hiện nhanh sự hiện diện của vi khuẩn *Salmonella* spp., *S. enterica* với kiểu huyết thanh *S. enteritidis* và *S. typhimurium* trong thực phẩm bằng kỹ thuật PCR đa mồi.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Tổng cộng có 260 mẫu thực phẩm được sử dụng trong thí nghiệm này. Trong đó có 40 mẫu thịt heo, 40 mẫu thịt bò, 60 mẫu thịt gà, 20 mẫu lòng trắng, đồ trứng gà, 20 mẫu vỏ trứng gà, 20 mẫu nem chua, 20 mẫu chả lụa, 10 mẫu ba khía, 10 mẫu da heo và 20 mẫu sò huyết được mua ở các chợ tại địa bàn thành phố Cần Thơ vào buổi sáng và chiều.

Nguồn vi sinh vật: Các giống vi khuẩn *S. enteritidis*, *S. typhimurium* được cung cấp từ Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh. Các giống *Salmonella* spp., *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* và *E.coli* được cung cấp từ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Cần Thơ.

2.2 Phương pháp

Chuẩn bị mẫu

Cân 25g mẫu cho vào túi nylon vô trùng, thêm vào túi 225 ml dung dịch môi trường buffer peptone water (BPW), đồng hóa mẫu bằng máy Stomacher (Laboratory Blender Stomacher 400, Seward Medical, Anh) trong 30 giây. Ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5 giờ, chuyển 1ml dung dịch mẫu nuôi cấy trong môi trường BPW qua bình tam giác 50ml có chứa 9ml môi trường Tetra Thionate Broth Base (TT) và nuôi ở 42°C trong 4 giờ. Cho 1ml dung dịch mẫu nuôi cấy từ môi trường TT qua bình tam giác 50ml có chứa 9 ml môi trường Rapport-Vasiliadis R10 Broth (RV), nuôi ở 42°C trong 15 giờ.

Các mẫu sau khi được nuôi cấy để tăng sinh khối vi sinh vật sẽ được ly trích DNA để kiểm tra sự hiện diện của *Salmonella* bằng kỹ thuật PCR.

Thiết kế các đoạn mồi PCR từ vi khuẩn *Salmonella*

Các đoạn mồi được thiết kế cho *Salmonella* spp. và *S. enterica* dựa trên trình tự gen *invA* và gen *spvC*. Trình tự nucleotid của gen *invA* và *spvC* đã sẵn có từ GenBank (accession number M90846 là của gen *invA*, và accession number FN432031 là của gen *spvC*). Các đoạn mồi được thiết kế với phần mềm DNAMAN 4.0.

Bảng 1: Trình tự của các mồi dùng để phát hiện gen *invA* và *spvC*

Tên mồi	Trình tự mồi	Sản phẩm khuếch đại
InvA For	5' TGG CAT TAT CGA TCA GTA CCA G 3'	600bp
InvA Rev	5' AAC AGC TGC GTC ATG ATA TTC C 3'	
spvC For	5' TCC CTC CTT TGA ATA TTG TAG CTG 3'	400bp
spvC Rev	5' GGG CTT GTT GAA CGA CCT TC 3'	

2.3 Ly trích DNA

Ly trích DNA bằng phương pháp phenol-chloroform:

Phương pháp trích này cơ bản dựa theo qui trình của Wilson *et al.* (1992) nhưng có một vài thay đổi: Cho vào tuýp nhựa 2 ml dung dịch nuôi vi khuẩn, ly tâm với tốc độ 13000 vòng/phút trong 10 phút. Đổ bỏ phần dung dịch nổi trên mặt, hoà tan phần tủa với 1ml TE (10 mM Tris + 1 mM EDTA, pH 8), ly tâm 13000 vòng/phút

trong 5 phút. Đổ bỏ dung dịch nổi trên mặt, hoà tan phần tủa với 350µl TE, cho tiếp 30 µl lysozyme (50 mg/ml) lắc đều nhẹ, đặt trên nước đá khoảng 30 phút. Cho vào 40µl SDS 10%, lắc đều cho đến khi dung dịch đồng nhất. Thêm 40µl proteinase K (10mg/ml), lắc đều và ủ ở nhiệt độ phòng từ 27-30°C trong 2-3 giờ. Tiếp tục cho vào 800 µl phenol (pH 7), lắc cho đến khi có màu trắng đục, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Hút phần dung dịch phía trên cho vào tuýp nhựa 1.5ml có sẵn 150 µl TE. Thêm vào một lượng tương đương (khoảng 700 µl) Phenol-Chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) lắc cho đến khi dung dịch có màu trắng đục, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Sau khi ly tâm, chuyển phần trong phía trên sang tuýp nhựa 1.5 ml mới có chứa sẵn 75 µl Sodium acetate (3M, pH 7.2), lắc đều bằng tay. Thêm vào 1 ml ethanol 96 %, lắc đều, đặt trong nước đá 10 phút. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút, đổ bỏ dung dịch, giữ lại phần tủa. Thêm ethanol 70 %, ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút, đổ bỏ dung dịch, làm khô phần tủa và hoà tan DNA với 30 µl nước cất vô trùng, trữ ở -20 °C.

2.4 Phản ứng PCR

Phản ứng PCR với một cặp mồi

Phản ứng PCR được thực hiện với các thành phần như sau: 50-100ng DNA, 2.5 µl buffer 10X (Tris 100mM, KCl 500mM, pH 9.0, 1% (v/v) Triton X-100), 3 µl MgCl₂ 25mM, 4 µl dNTP (0.2 mM mỗi loại), 0.4µM của mỗi loại mồi (mồi ngược và mồi xuôi), 0.25 µl Taq DNA polymerase (5U/µl), 0.25 µl BSA(0.1%). Thêm nước cất vô trùng cho đủ thể tích 25µl. Phản ứng khuếch đại được tiến hành ở 95°C trong 5 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ với các bước như sau: biến tính ở 95°C trong 30 giây, bắt cặp mồi vào khuôn ở 60°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 1 phút. Cuối cùng phản ứng được duy trì 72°C trong 10 phút.

Phản ứng PCR đa mồi

Đối với PCR đa mồi, 2 cặp mồi (cặp mồi invA và cặp mồi spvC) đã được sử dụng trong cùng một phản ứng PCR: Thành phần của phản ứng PCR đa mồi gồm có: 50-100ng DNA, 2.5 µl buffer 10X (Tris 100mM, KCl 500mM, pH 9.0, 1% (v/v) Triton X-100), 3 µl MgCl₂ 25mM, 4 µl dNTP (0.2 mM mỗi loại), 0.8µM của mỗi loại mồi (mồi ngược và mồi xuôi), 0.25 µl Taq DNA polymerase (5U/µl), 0.25 µl BSA(0.1%). Thêm nước cất vô trùng cho đủ thể tích 25µl.

Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR đa mồi gồm biến tính ở 94°C trong 2 phút, tiếp theo tổng số 35 chu kỳ gồm giai đoạn biến tính ở 94°C trong 45 giây, gắn mồi ở 60°C trong 1 phút và kéo dài ở 72°C trong 1 phút 30 giây, sau cùng phản ứng được duy trì 72°C trong 7 phút.

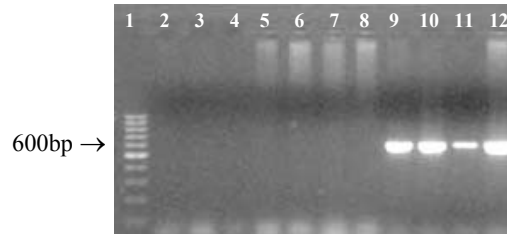
2.5 Phân tích sản phẩm PCR

Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được phân tích bằng điện di trên gel 1.5% agarose trong dung dịch đệm TBE 1X và chụp bằng máy chụp hình gel Biorad UV 2000. Thang chuẩn 100bp của công ty Fermentas đã được sử dụng để ước lượng kích thước đoạn sản phẩm PCR.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tính chuyên biệt của cặp mồi invA

Để đánh giá tính chuyên biệt của cặp mồi invA, các dòng vi khuẩn sau đây đã được sử dụng để kiểm tra *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Salmonella* spp., *B. subtilis*, *S. aureus* và *E. coli*. Qua phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose, kết quả cho thấy DNA từ các dòng *Salmonella* đều có sản phẩm khuếch đại với kích thước 600bp. Tuy nhiên, cũng với điều kiện PCR này nhưng DNA từ vi khuẩn *B.subtilis*, *S. aureus* và *E. coli* không khuếch đại được bất kỳ sản phẩm PCR nào (Hình 1).



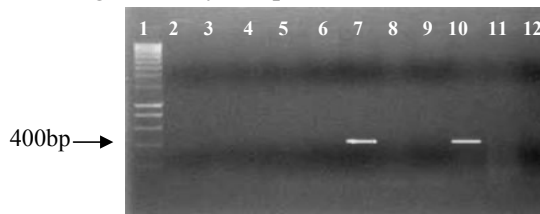
Hình 1: Kết quả PCR sử dụng cặp mồi invA

Giếng 1: Thang chuẩn 100bp (Fermentas), Giếng 2-3: *B. subtilis*; giếng 4: Nước; giếng 5-6: *S. aureus*; giếng 7-8: *E.coli*; giếng 9: *S. typhimurium*; giếng 10: *S. enteritidis*; giếng 11-12: *Salmonella* spp.

Theo Galan (1991), tất cả kiểu huyết thanh *Salmonella* đều mang gen invA giúp vi khuẩn xâm nhiễm vào tế bào biểu mô ruột và trình tự tương tự gen invA không tìm thấy ở *E. coli*. Để nhận diện các dòng vi khuẩn *Salmonella* bằng kỹ thuật PCR nhiều tác giả như Rahn (1992); Zahraei *et al.* (2005); Kumar *et al.* (2006) đã thiết kế các cặp mồi chuyên biệt dựa trên trình tự gen invA. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng chứng tỏ cặp mồi invA là rất chuyên biệt cho vi khuẩn *Salmonella*.

3.2 Tính chuyên biệt của cặp mồi spvC

Để đánh giá tính chuyên biệt của cặp mồi spvC các giống vi khuẩn *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Salmonella* spp., *B.subtilis*, *S. aureus* và *E. coli* đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Kết quả (hình 2) cho thấy chỉ có *S. enteritidis* và *S. typhimurium* có sản phẩm khuếch đại 400 bp tương ứng với giếng 7 và 10. Các mẫu còn lại không có bất kỳ sản phẩm khuếch đại nào.



Hình 2: Kết quả PCR sử dụng cặp mồi spvC

Giếng 1: Thang chuẩn 100bp (Fermentas), giếng 2-3: *E.coli*; giếng 4-5: *B. subtilis*; giếng 6: Nước; giếng 7: *S. typhimurium*; giếng 8,9: *Salmonella* spp; giếng 10: *S. enteritidis*; giếng 11-12: *S. aureus*.

Vùng gen spvC là gen chủ yếu của *S. enteritidis* và *S. typhimurium* có khả năng gây độc và làm chết trên chuột (Suzuki *et al.*, 1994; Matsui *et al.*, 2001)

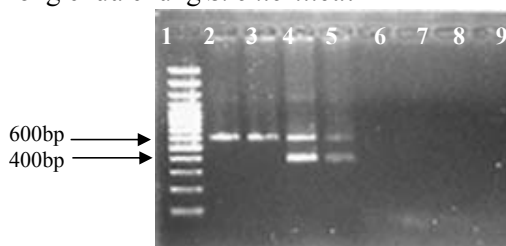
Theo nghiên cứu của Mazurkiewicz *et al.* (2008) spvC có chức năng phân hủy phosphothreonin làm bất hoạt enzyme MAPK ở tế bào chủ khi nó xâm nhiễm.

Chiu, Ou (1996) đã thiết kế cặp mồi spvC từ vị trí nucleotid 505 đến 1075 của gen này để nhận diện *S. enteritidis* trong phân của trẻ em và kết quả từ nghiên cứu này cho thấy hiệu quả của kỹ thuật PCR là 95% cao hơn phương pháp nuôi cấy truyền thống (60%).

Nguyễn Tiến Dũng và Trần Linh Thuớc (2003) đã thông báo cặp mồi dựa trên gen spvC rất chuyên biệt cho *S. enteritidis*, *S.typhimurium*, các vi sinh vật như *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Rhodococcus*, *Streptococcus*, *Shigella*, *Listeria* đều âm tính với cặp mồi spvC. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng đã cho thấy chỉ có dòng vi khuẩn *S. enteritica* (*S. enteritidis* và *S. typhimurium*) có chứa gen spvC.

3.3 Sử dụng phối hợp hai cặp mồi invA và spvC trong PCR đa mồi

Mặc dù hai cặp mồi invA và spvC rất chuyên biệt cho *Salmonella* nhưng khi sử dụng riêng lẻ từng cặp mồi trong phản ứng PCR thì cặp mồi invA chỉ cho biết kết quả sơ bộ mẫu có nhiễm *Salmonella* hay không chứ không cho biết mẫu có chứa chủng *S. enteritica* (*S. typhimurium* hay *S. enteritidis*). Ngược lại nếu sử dụng cặp mồi spvC để kiểm tra sự hiện diện chung của vi khuẩn *Salmonella* thì phần lớn kết quả thường cho âm tính vì *Salmonella* spp. thường chiếm đa số trong môi trường trong khi chủng *S. enteritica* hiện diện trong môi trường với mật độ rất thấp (Nguyễn Tiến Dũng và Trần Linh Thuớc (2003). Để khắc phục nhược điểm này, chúng tôi đã phối hợp cả hai cặp mồi invA và spvC trong cùng một phản ứng PCR. Kết quả (hình 3) cho thấy khi phân tích sản phẩm PCR, những mẫu nào xuất hiện hai vạch 600bp và 400bp chứng tỏ mẫu đó có chứa vi khuẩn *S. enteritica*, những mẫu chỉ xuất hiện một vạch 600bp chứng tỏ mẫu chỉ chứa vi khuẩn *Salmonella* spp. nhưng không chứa chủng *S. enteritica*.



Hình 3: Phát hiện *Salmonella* spp. và *S. enteritica* bằng PCR đa mồi

Giếng 1: Thang chuẩn 100bp (Fermentas), giếng 2-3: *Salmonella* spp; giếng 4: *S. typhimurium*; giếng 5: *S. enteritidis*; giếng 6-7: *E.coli*; giếng 8: *S. aureus*; giếng 9: Nước

Để nhận diện vi khuẩn *S. enteritidis* Chiu, Ou (1996) đã sử dụng PCR với hai cặp mồi invA và spvC. Zahraei Salehi *et al.* (2007) đã sử dụng bốn cặp mồi invA, fliC, fljB và rfbJ trong phản ứng PCR đa mồi để nhận diện vi khuẩn *S. typhimurium* rất hiệu quả.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng đã chứng tỏ những ưu điểm của kỹ thuật PCR đa mồi vừa nhạy bén để phát hiện cùng lúc hai dòng vi khuẩn *Salmonella* spp. và *S. enteritica* vừa rất kinh tế lại tiết kiệm được thời gian rất nhiều.

3.4 Ứng dụng kỹ thuật PCR đa môi để phát hiện sự hiện diện vi khuẩn *Salmonella* trong thực phẩm

Trong nghiên cứu này có 260 mẫu thực phẩm được mua ở các chợ trong địa bàn thành phố Cần Thơ để kiểm tra sự hiện diện của vi khuẩn *Salmonella* bằng kỹ thuật PCR đa môi. Kết quả từ bảng 2 cho thấy trong 20 mẫu nem chua đã kiểm tra có 4 mẫu cho kết quả dương tính với *Salmonella* spp. chiếm tỷ lệ 20% và tất cả đều âm tính với *S. enteritica*.

Trong 40 mẫu thịt heo được kiểm tra có 19 mẫu nhiễm *Salmonella* chiếm tỷ lệ 47.5%. Đặc biệt những mẫu thịt heo mua buổi chợ chiều có tỷ lệ nhiễm *Salmonella* cao hơn khi mua buổi chợ sáng (30% thịt heo chợ chiều nhiễm *Salmonella* spp. và 2.5% thịt heo chợ chiều nhiễm *S. enteritica*, thịt heo mua chợ sáng có tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. là 15% và không phát hiện thấy có nhiễm vi khuẩn dòng *S. enteritica*.

Bảng 2: Sự hiện diện của vi khuẩn *Salmonella* spp., *S. enteritica* trong thực phẩm ở địa bàn thành phố Cần Thơ

Đối tượng mẫu	Số mẫu	<i>Salmonella</i> spp	<i>S. typhimurium</i> hoặc <i>S. enteritidis</i>
Nem chua	20	4	0
Thịt heo chợ sáng	20	6	0
Thịt heo chợ chiều	20	12	1
Thịt bò chợ sáng	20	2	0
Thịt bò chợ chiều	20	9	1
Thịt gà chợ sáng	30	8	0
Thịt gà chợ chiều	30	19	1
Lòng trắng, đỏ trứng gà	20	2	0
Vỏ trứng gà	20	6	2
Chả lụa	20	2	0
Ba khía	10	0	0
Sò huyết	20	8	1
Bì heo	10	2	0

Trong 40 mẫu thịt bò được kiểm tra có 30% mẫu nhiễm *Salmonella*, trong đó có 2 mẫu thu vào buổi chợ sáng và 9 mẫu buổi chợ chiều cho kết quả dương tính với *Salmonella* spp., và 1 mẫu thịt bò chợ chiều cho kết quả dương tính với *S. enteritica*.

Trong 60 mẫu thịt gà được kiểm tra có 46.7% mẫu nhiễm *Salmonella*, trong đó có 8 mẫu thu vào buổi sáng, 19 mẫu thu vào buổi chợ chiều cho kết quả dương tính với *Salmonella* spp., và 1 mẫu thịt gà chợ chiều cho kết quả dương tính với *S. enteritica*. Trong quá trình giết mổ, thân gà thường ngâm và rửa trong nước nên thịt gà dễ tiếp xúc với lông gà, phân gà. Nước rửa thân gà trong quá trình giết mổ có thể sử dụng rửa cho nhiều con nên khả năng thịt gà bị nhiễm khuẩn chéo giữa các mẫu qua nguồn nước rất cao.

Trong 20 mẫu trứng gà có 2 mẫu từ lòng trắng và lòng đỏ trứng, 6 mẫu vỏ trứng gà cho kết quả dương tính với *Salmonella* spp. và 2 mẫu vỏ trứng gà cho kết quả

dương tính với *S. enteritica*. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở vỏ trứng gà (30%) cao hơn lòng trắng và đỏ trứng gà (10%).

Trong số 20 mẫu chả lụa kiểm tra đã phát hiện 10% mẫu nhiễm *Salmonella* spp. và không phát hiện mẫu nào nhiễm *S. enteritica*.

Trong 10 mẫu ba khía được kiểm tra đều cho kết quả âm tính với vi khuẩn *Salmonella* có thể các mẫu thực phẩm này có nồng độ muối cao nên không phải là điều kiện thích hợp cho vi khuẩn *Salmonella* phát triển.

Đối với thực phẩm hải sản có vỏ, trong khảo sát này cho thấy 8 trong số 20 mẫu sò huyết được mua ở chợ đã bị nhiễm *Salmonella* spp. chiếm tỷ lệ 40% trong đó có 1 mẫu phát hiện nhiễm *S. enteritica* chiếm tỷ lệ 5%.

Số mẫu bì heo dương tính với *Salmonella* spp. là 2 trong tổng số 10 mẫu khảo sát và không có mẫu nào phát hiện nhiễm *S. enteritica*.

Báo cáo của Hao *et al.* (2007) cho biết tỷ lệ thịt heo bị nhiễm *Salmonella* spp. ở chợ và siêu thị thành phố Hồ Chí Minh là 64%, thịt bò là 62%, sò là 19%. Ở ĐBSCL tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trên thịt heo là 69,9% , thịt bò là 48.6%, tôm 24.5% (Phan *et al.* 2005). Theo Nguyễn Ngọc Tuấn *et al.* (2006) cho thấy tỷ lệ thịt heo nhiễm *Salmonella* spp. ở các tỉnh miền Tây Nam bộ từ năm 2004-2005 là 59,7%, biến thiên từ 20% đến 90%. Trên thế giới, tỷ lệ thịt heo bị nhiễm *Salmonella* ở Hà Lan là 23%, ở Đức là 7% (Nowak, 2007) và ở Thái Lan là 29% (Padungtod *et al.* 2006). Theo Vo *et al.* (2006), trong số 297 kiểu huyết thanh phân lập được ở người, thịt bò, thịt heo và thịt gà ở ĐBSCL thì *S. typhimurium* chiếm 15,8%. Theo Cédric *et al.* (2006), trong số các kiểu huyết thanh phân lập trong quá trình giết mổ heo ở Hà Nội thì *S. typhimurium* chiếm 10% và *S. enteritidis* chiếm 3%.

Ở các nước khác, theo nghiên cứu của Piskus *et al.* (2008), tỷ lệ thịt gà bị nhiễm *Salmonella* spp. là 29% ở Lithuania, 20% ở Ý và 11% ở Hà Lan. Báo cáo của Shoba *et al.*, (1996) cho thấy 100% *Salmonella* được phân lập từ trứng đều mang plasmid spv. Theo Huong *et al.* (2006) trong số các kiểu huyết thanh phân lập từ thịt gà ở Hà Nội, *S. typhimurium* chiếm tỷ lệ 7,75 %. Theo nghiên cứu của Nguyễn Thu Tâm (2008), ở các chợ trong thành phố Cần Thơ, tỷ lệ nhiễm *Salmonella* spp. ở thịt gà là 25,3%, ở vỏ trứng là 2,2%, ở lòng đỏ trứng gà là 5,6%. Tỷ lệ nhiễm *S. enteritidis* ở thịt gà là 4,7%, ở vỏ trứng gà là 3,3% và ở lòng đỏ trứng gà là 3,3%. Tỷ lệ nhiễm *S. typhimurium* ở thịt gà là 2,7%, vỏ trứng gà là 3,3% và lòng đỏ trứng gà 2,2%.

Theo kết quả nghiên cứu của Phạm Minh Thu *et al.* (2006), các mẫu thực phẩm trên thị trường thành phố Hồ Chí Minh thì có 10/10 mẫu chả lụa phát hiện nhiễm *Salmonella* spp.

Phần lớn các kết quả nghiên cứu của các báo cáo vừa nêu đều dùng phương pháp nuôi cấy truyền thống để nhận diện *Salmonella* (Phan *et al.*, 2005, Hao *et al.*, 2007, Huong *et al.*, 2006, Vo *et al.*, 2006, Tâm, 2008). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy quy trình PCR này mang lại kết quả chính xác, lại nhanh gọn và độ nhạy rất cao. Từ kết quả này cũng cho thấy hiện trạng ô nhiễm trong thức ăn là khá cao, các loại thịt mua buổi chợ chiều có tỷ lệ nhiễm *Salmonella* cao hơn chợ

buổi sáng. Phần lớn thực phẩm bị nhiễm bởi *Salmonella* spp., tỷ lệ thực phẩm nhiễm *S. enteritica* có mang gen *spvC* là khá thấp.

4 KẾT LUẬN

Cặp mồi *invA* rất chuyên biệt để phát hiện dòng vi khuẩn *Salmonella* spp. và cặp mồi *spvC* rất chuyên biệt để phát hiện dòng vi khuẩn *S. enteritica*.

Phối hợp hai cặp mồi trong cùng một phản ứng PCR giúp phát hiện cùng một lúc cả hai dòng vi khuẩn *Salmonella* spp và *S. enteritica* giúp tiết kiệm thời gian và kinh phí.

Hiện trạng ô nhiễm vi khuẩn *Salmonella* trong thực phẩm là khá cao. Đặc biệt các loại thịt được bày bán chợ chiều có tỷ lệ nhiễm *Salmonella* cao hơn chợ buổi sáng. Phần lớn các thực phẩm bị nhiễm bởi dòng vi khuẩn *Salmonella* spp. Sự hiện diện của dòng vi khuẩn *S. enteritica* trong thực phẩm là khá thấp

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baay MFD and Huis in't Veld JHJ (1993) Alternative antigens reduce cross-reactions in an ELISA for the detection of *Salmonella enteritidis* in poultry. *J Appl Bacteriol* 77:243-247.
- Cédric LB, Hanh TT, Thanh NT, Thuong DD and Thuy NC (2006) Prevalence and epidemiology of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in small pig slaughtering units in Hanoi, Vietnam. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1081, pp. 269-272
- Chiu CH and Ou JT (1996) Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol* 34, 2619-2622.
- Galan JE, Ginocchio C and Costeas P (1992) Molecular and functional characterization of the salmonella invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family. *J bacteriol* 174(13): 4338-4349
- Galan JE and Curtiss R (1991) Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect Immun.* 59(9), 2901-2908
- Gentry-Weeks C, Hutcheson HJ, Kim LM, Bolte D, Traub-Dargatz J, Morley P, Powers B and Jessen M (2002) Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of *Salmonella* spp. *J Clin Microbiol* 40, 1487-1492.
- Gulig PA, Danbara H, Guiney DG, Lax AJ, Norel F, and Rhen M (1993) Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol. Microbiol* 7:825-830
- Hao VTT, Moutafis G, Istivan T, Thuoc TL and Coloe PJ (2007) Detection of *Salmonella* spp. in retail raw food samples from Vietnam and characterization of their antibiotic resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (21), pp. 6885-6890.
- Herikstad HY and Tauxe MRV (2002) *Salmonella* Surveillance: a Global Survey of Public Health Serotyping. *Epidemiol Infection* 129, 1-8.
- Huong LQ, Fries R, Padungtod P, Hanh TT, Kyule M, Baumann MPO and Zessin KH (2006) Prevalence of *Salmonella* in retail chicken meat in Hanoi, Vietnam. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1081, pp.257-261
- International Organization for Standardization (2003) Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* (ISO 6579:2003), Geneva.
- Kent PT, Thomason BM, Morris GK (1981) *Salmonellae* in Foods and Feeds. p. 29, USA: Department of Health and Human Services, Atlanta.

- Kumar S, Balakrishna K and Batra HV (2006) Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi (S. Typhi) by selective amplification of *invA*, *viaB*, *fliC-d* and *prt* genes by polymerase chain reaction in multiplex format. *Lett Appl Microbiol* 42:149-54.
- Libby SJ, Lesnick M, Hasegawa P, Weidenhammer E and Guiney DG (2000) The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Cellular Microbiol* 2: 49-58.
- Lin CL, Chiu CH, Chu C, Huang YC, Lin TY and Ou JT (2007) A multiplex chain reaction method for rapid identification of *Citrobacter freundii* and *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 40: 222-226.
- Mazurkiewicz P, Thomas J, Thompson JA, Liu M, Arbibe L, Sansonetti P and Holden DW (2008) *SpvC* is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Mol Microbiol.* 67:1371-1383
- Nguyễn Ngọc Tuấn, Lê Hữu Ngọc và Huỳnh văn Điềm (2006) Tình hình nhiễm *Salmonella* trong phân và thịt heo, bò tại một số tỉnh miền Tây Nam bộ. *Tạp chí KHKT Nông Lâm nghiệp.* 1
- Nguyễn Thu Tâm (2008) Tình hình nhiễm vi khuẩn *S. Enteritidis* và *S. Typhimurium* trên thịt và trứng gà ở một số cơ sở phân phối thực phẩm ở Thành phố Cần Thơ. Đề tài nghiên cứu khoa học cấp trường.
- Nguyễn Tiến Dũng và Trần Linh Thuộc (2003) Khảo sát sự hiện diện của plasmid *spv* ở các *Salmonella* phân lập từ nước và thủy sản. *Tạp chí di truyền học và Ứng dụng.* Số 2.
- Matsui H, Bacot CM, Garlington WA, Doyle TJ, Roberts S, Gulig PA (2001) Virulence plasmid-borne *spvB* and *spvC* genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *J Bacteriol.* 183:4652–4658.
- Nowak BT, Müffling V, Chaunchom S and Hartung J (2007) *Salmonella* contamination in pigs at slaughter and on the farm: A field study using an antibody ELISA test and a PCR technique. *International Journal of Food Microbiology* 115, pp. 259–267
- Oliveira SD, Rodenbusch CR, Michael G, Cardoso MIR, Canal CW and Brandelli A (2003) Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different sources. *Braz. J. Microbiol.* 34, 123-124.
- Padungtod PJ and Kaneene B (2006) *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. *Int. J. Food Microbiol.* 108: 346-354.
- Phạm Minh Thu, Phan Thu Dòng, Trương Xuân Liên (2006). Hai mươi bốn giờ phát hiện *Salmonella* spp. trong thực phẩm bằng phương pháp PCR. Liên hiệp các hội khoa học & kỹ thuật Việt Nam. Trung tâm khoa học & công nghệ thực phẩm. <http://vietnamfood.com.vn/news> (12/6/2010)
- Phan TT, Khai LT, Ogasawara N, Tam NT, Okatani AT, Akiba M and Hayashidani H (2005) Contamination of *Salmonella* in retail meats and shrimps in the Mekong Delta, Vietnam. *J Food Prot.*, 68 (5), pp.1077-80.
- Piskus J, Franciosini MP, Proietti PC, Reich F, Kazeniauskas E, Butrimaite-Ambrozeviciene C, Mauricas M and Bolder N (2008) Preliminary investigations on *Salmonella* spp. Incidence in Meat Chicken. *International Journal of Poultry Science* 7 (8), pp. 813-817.
- Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galan JE, Ginocchio C, Curtiss R and Gyles CL (1992) Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes* 6(4), 271-9
- Shoba CS, Banhart HM, Lee MD and Dreesen DW (1996) Virulence determinants *invA* and *spvC* in *Salmonella* isolated from poultry products wastewater and Human sources. *Applied and Environmental Microbiology* 2, pp. 3768-3771.
- Suzuki S, Komase K, Matsui H, Abe A, Kawahara K, Tamura Y, Kijima M, Danbara H, Nakamura M, Sato S (1994) Virulence region of plasmid pNL2001 of *Salmonella enteritidis* *Microbiology* 140:1307-1318.

- Tan WL and Shelef A (1999) Automated detection of *Salmonella* spp. in foods. *J Microbiol Methods* 37, 87-91.
- TCVN: 7926-2008 và TCVN 6040: 2007
- Vo ATT, Duijkeren EV, Fluit AC, Heck MEOC, Verbruggen A, Maas HME and Gaastra W (2006) Distribution of *Salmonella enterica* Serovars from humans, livestock and meat in Vietnam and the Dominance of *Salmonella* Typhimurium Phage Type 90. *Vet Microbiol* 113: 153–158.
- Wilson MAR, Rimler B and Hofman LJ (1992) Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup B and E *Pasteurella multocida*. *J. clin. Microbiol* 30,1518-1524.
- Zahraei Salehi T, Mahzounieh M and Saeedzadeh A (2005) Detection of *invA* gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method. *Int J Poult Sci* 4(8), 557–559