



ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG NHIỄM *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* VÀ *SALMONELLA SPP.* TRONG CÁC MẪU SỮA THU THẬP TẠI GIA LÂM VÀ BA VÌ, HÀ NỘI ĐẦU NĂM 2019

Nguyễn Thị Minh Huyền^{1*}, Trần Thị Hoa¹, Ninh Thị Tuyết Lan¹, Trần Thị Hiền²

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

(Ngày đến tòa soạn: 30/6/2019; Ngày sửa bài sau phản biện: 24/11/2019;

Ngày chấp nhận đăng: 30/11/2019)

Tóm tắt

Sữa và các sản phẩm sữa từ các hộ chăn nuôi bò sữa xung quanh Hà Nội đã góp phần không nhỏ vào sản lượng sữa được tiêu thụ tại Hà Nội. Việc sử dụng sữa tươi hay sữa thanh trùng đã trở nên khá thường xuyên trong sinh hoạt hàng ngày của người dân. Sữa tươi được bày bán rất nhiều tại một số các cửa hàng trên dọc các trục đường ven đô đặc biệt là ở vùng Xuân Mai, Ba Vì, Hà Nội hay Phù Đổng, Gia Lâm, Hà Nội. Các loại sữa này phần lớn đã được thanh trùng và đóng chai. Hiện nay chưa có nghiên cứu nào đánh giá về khả năng nhiễm các loại vi khuẩn có thể gây ngộ độc thực phẩm trong sữa và các sản phẩm sữa này để đánh giá sự an toàn khi tiêu thụ. Trong nghiên cứu của chúng tôi, một số mẫu sữa đã thanh trùng và sữa chưa thanh trùng được thu thập để kiểm tra sự có mặt của một số vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm như *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* bằng phương pháp PCR. Đây là một phương pháp kiểm tra nhanh và chính xác do có khả năng nhân bản gene đặc hiệu riêng cho từng vi khuẩn cần nhận biết. Trong 49 mẫu thu thập, có 23 mẫu sữa chưa thanh trùng, 12 mẫu sữa đã thanh trùng và 14 mẫu sữa chua. Kết quả cho thấy có 01 mẫu sữa dê đã thanh trùng có khả năng nhiễm vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và 01 mẫu sữa tươi chưa thanh trùng có khả năng nhiễm khuẩn *Listeria monocytogenes*. Tất cả các mẫu sữa và sữa chua đều âm tính với *Salmonella spp.* Các mẫu nhiễm khuẩn này đã được khẳng định bằng cách đọc trình tự gene.

Từ khóa: Vi khuẩn, ngộ độc thực phẩm, sữa, nhiễm khuẩn, Hà Nội.

1. MỞ ĐẦU

Đất nước phát triển kèm theo chất lượng cuộc sống của người dân được nâng cao hơn. So với những năm cuối của thế kỷ 20 thì bước sang thế kỷ 21, việc chăn nuôi bò sữa và sản xuất sữa ở Việt Nam đã phát triển mạnh hơn rất nhiều. Sữa tại Việt Nam hiện nay không còn hoàn toàn là sữa bột nhập ngoại và được chế biến lại nữa mà đã có rất nhiều doanh nghiệp cũng như các hộ nông dân chăn nuôi bò sữa để cung cấp sữa tươi, tự túc được một phần của nguồn nguyên liệu. Chúng ta đã có cơ hội sử dụng các sản phẩm sữa tươi từ bò hay dê được nuôi tại Việt Nam và các sản phẩm từ sữa rất đa dạng. Theo thống kê mới nhất của Tổng cục Thống kê ngày 01/10/2018, cả nước có 294,4 ngàn con bò sữa năm 2018, tăng hơn rất nhiều so với năm 2010 là 128,6 ngàn con. Sản lượng sữa năm 2010 đạt 306,7 ngàn tấn và tăng lên 936 ngàn tấn vào

* Điện thoại: 0947479978 Email: ntminhhuyen@ibt.ac.vn

năm 2018 [1]. Ngoài các doanh nghiệp lớn như Vinamilk, TH True Milk, Mộc Châu Milk, hiện nay sữa được rất nhiều hộ gia đình sản xuất và kinh doanh nhỏ lẻ. Những hoạt động của họ liên quan từ 5 đến 10% của sữa tươi ở các địa phương và việc bán hàng hoặc là trực tiếp cho người sử dụng hoặc là cho người bán lẻ khác, ở khu vực Hà Nội [2]. Sản phẩm của họ thường rẻ hơn so với cùng sản phẩm từ các công ty lớn bởi vì họ bỏ được những bước trung gian thường làm tăng thêm giá của sản phẩm đến người tiêu dùng [3]. Mặc dù họ là các nhà sản xuất nhỏ, các sản phẩm của họ ngày càng được nhiều người biết đến. Do đó, các sản phẩm của họ cũng đóng một vai trò nhất định trong thị trường sữa và các sản phẩm sữa ở miền bắc Việt Nam. Tuy nhiên, cùng với tình hình đó thì việc kiểm soát chất lượng sữa rất quan trọng bởi sữa là sản phẩm dễ nhiễm khuẩn nếu như trong quá trình sản xuất, các dụng cụ không được tiệt trùng cẩn thận. Sự nhiễm khuẩn ở sữa và các sản phẩm sữa không chỉ từ sữa thô mà còn từ các quá trình chế biến, vận chuyển và dự trữ sữa không đúng cách [4, 5]. Do đó, việc đánh giá chất lượng sữa và các sản phẩm từ sữa bằng cách kiểm tra khả năng nhiễm khuẩn để tránh những bệnh bùng phát là rất quan trọng. Nghiên cứu này bước đầu thiết lập một phương pháp đánh giá nhanh khả năng nhiễm một số vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm như *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* bằng PCR. Đây là một phương pháp cho kết quả chính xác và rút ngắn thời gian hơn rất nhiều so với các phương pháp vi sinh truyền thống.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Chủng chuẩn: chủng *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae O1* do Công ty Cổ phần Công nghệ vi sinh và môi trường, Hà Nội cung cấp; Chủng *Staphylococcus aureus* và chủng *Escherichia coli Shigella* được tặng bởi Bộ môn Vi sinh, Đại học Y Thái Nguyên; Chủng *Listeria monocytogenes* mua tại khoa Vi sinh vật, Bệnh viện Quân Y 103, Hà Đông, Hà Nội. Các chủng này đều được phân lập bởi chính các nơi trên.

- Kit tinh sạch ADN, thang chuẩn ADN 1kb (Thermo scientific, Đức); hóa chất để chạy PCR (Phusa Biochem, Việt Nam); thang chuẩn Ladder 100 bp (BioFact, Korea).

Các hóa chất khác sử dụng trong nghiên cứu này như EDTA, Tris-HCl, PBS, lysozyme, acetic acid, agarose... được mua từ các hãng chuyên sản xuất uy tín trên thế giới, theo đúng chuẩn cho sinh học phân tử.

- Sữa và sữa chua được thu mua chủ yếu ở hai vùng Gia Lâm và Ba Vì, Hà Nội. Mẫu tại Ba Vì được thu mua ngẫu nhiên tại các đại lý dọc trục đường Xuân Mai, Ba Vì. Mẫu sữa chua thanh trùng tại Gia Lâm được thu mua của các hộ chăn nuôi bò tại hai xã Phù Đổng và Dương Hà khi họ mang đến bán cho đại lý của một công ty sữa lớn tại đó. Sau khi thu, mẫu được lưu trữ trong tủ đông -20°C cho đến khi được sử dụng để tách chiết ADN.

- Thiết kế môi cho PCR: Môi thiết kế cho phản ứng PCR được tham khảo từ một số tài liệu nghiên cứu trong đó các tác giả đã tối ưu đặc hiệu cho các vi khuẩn *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* và dựa trên phần mềm online Primer 3 Plus. Trong đó môi cho *Listeria monocytogenes* đặc hiệu cho gene *hly A*, là gene mã hóa cho listeriolysin O (LLO) có liên quan đến sự thủy phân màng không bào của vật chủ. Gene này tồn tại ở tất cả các chủng *Listeria monocytogenes* và cần thiết để tạo đầy đủ độc lực của nó [6]. Môi đặc hiệu cho *Salmonella spp.* được thiết kế dựa trên gene *sdiA*, là gene mã hóa cho thụ thể tín hiệu của các chất điều hòa họ LuxR. Các protein type LuxR điều hòa các nhân tố phụ có thể đóng góp cho sự tồn tại hoặc hình thành tập đoàn trong ruột của vi khuẩn *Salmonella spp.* [7]. Đối với *Staphylococcus aureus*, môi được thiết kế đặc hiệu cho gene *nuc*, là gene mã hóa cho nuclease ổn nhiệt của *Staphylococcus aureus*. Đây là một endonuclease, phân hủy cả ADN và ARN và hoạt động enzyme của nó có thể chịu được ở 100°C trong ít nhất 1h [9]. Môi được thiết kế đặc hiệu để



nhận biết sự có mặt của các vi khuẩn này và được trình bày ở bảng 1 dưới đây:

Bảng 1. Các môi sử dụng cho phản ứng PCR

Gene mục tiêu	Tên primer	Trình tự (5'-3')	Tm (°C)	Chủng vi khuẩn nhận biết	Độ dài đoạn gene nhân bản	Tài liệu tham khảo
lyA	LL4R	CGC CAC ACT TGA GAT AT	50	<i>Listeria monocytogenes</i>	519 bp	[6]
	LL5F	AAC CTA TCC AGG TGC TC	52,4			
sdiA	SdiA1	AAT ATC GCT TCG TAC CAC	51,6	<i>Salmonella spp.</i>	257 bp	[7]
	SdiA2	GTA GGT AAA CGA GGA GCA G	57,3			
nuc	Stanucf	ATA GGG ATG GCT ATC AGT AA	54,3	<i>Staphylococcus aureus</i>	476 bp	Nghiên cứu này và [9]
	Stanucr	TAC CAT TTT TCC ATC AGC ATA A	54,7			

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách ADN tổng số của chủng chuẩn

ADN tổng số của các chủng vi khuẩn như *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* và một số chủng khác như *Vibrio cholerae O1*, *Escherichia coli Shigella* được tách sử dụng bộ Kit Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit; theo protocol của nhà sản xuất dành cho vi khuẩn gram âm (*Salmonella spp.*, *Escherichia coli Shigella*, *Vibrio cholerae O1*) và vi khuẩn gram dương (*Listeria monocytogenes* và *Staphylococcus aureus*). Cụ thể phương pháp tách có thể được tóm tắt như sau:

- Đối với vi khuẩn Gram âm, thu tế bào trong ống ly tâm 1,5 hoặc 2 ml. Hòa lại cặn tế bào trong 180 µL dung dịch Digestion, thêm 20 µL dung dịch protein K và trộn đều. Ủ mẫu ở 56°C trong 30 phút. Thêm 20 µL dung dịch RNase A, vortex và ủ thêm 10 phút ở nhiệt độ phòng. Thêm 200 µL dung dịch lysis vào mẫu và trộn đều. Thêm 400 µL của 50% cồn tinh khiết và trộn đều. Sau đó chuyển toàn bộ dịch sang cột, ly tâm ở 6000 g trong 1 phút. Rửa mẫu lần lượt với 500 µL Wash buffer I và Wash buffer II. Sau đó ly tâm thêm 1 phút để loại sạch cồn có thể còn trong cột. Chuyển cột sang ống mới, thêm 100 hoặc 200 µL Elution buffer và ủ 2 phút ở nhiệt độ phòng. Ly tâm ở tốc độ 8000 g/phút trong 1 phút. Loại bỏ cột và dự trữ ADN ở -20°C cho đến khi sử dụng. Nồng độ ADN được xác định bằng cách đo hấp thụ với máy nanodrop. Kết quả thu được được phân mềm tự động của máy tính ra nồng độ ADN theo ng/µL. Các mẫu ADN được lưu trữ trong tủ âm 20°C đến khi sử dụng để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

- Đối với vi khuẩn gram dương, các bước tách chiết cũng được tiến hành tương tự, ngoại trừ bước ly giải tế bào. Cụ thể như sau: dung dịch ly giải tế bào cho vi khuẩn gram dương: 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA, 1,2% Triton x-100, thêm lysozyme đến nồng độ 20 mg/mL trước khi dùng. Đầu tiên, tế bào sau khi thu bằng ly tâm sẽ được ủ với 180 µl dung dịch trên trong 30 phút ở 37°C. Sau đó thêm 200 µL dung dịch lysis, 20 µL proteinase K và trộn đều, ủ thêm ở 56°C trong 30 phút. Các bước tiếp theo tiến hành như đối với vi khuẩn gram âm. Nồng độ ADN được xác định bằng cách đo hấp thụ với máy nanodrop và tương tự như trên, các mẫu ADN được lưu trữ trong tủ âm 20°C đến khi sử dụng để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Tách ADN tổng số từ sữa và sữa chua

Do ADN từ sữa có nhiều loại (vi khuẩn có thể có trong sữa, ADN còn lại từ vật nuôi cho sữa...), ngoài ra trong sữa còn rất nhiều các thành phần protein khác nên việc tách ADN phức

tạp hơn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi vẫn sử dụng kit để tách ADN. Tuy nhiên các bước chuẩn bị trước khi tách ADN được thực hiện như sau: 2ml sữa được ly tâm trong 10 phút ở 10000 g, 3 phút ở 12000 g, và 5 phút ở 5000 g. Phần lớp chất béo và dịch nổi được loại bỏ. Tùy thuộc vào lượng chất béo còn lại trong ống mà các bước rửa được tiến hành như sau: thêm 500 μL của dung dịch 5x SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M trisodium citrate dihydrate) và 75 μL của dung dịch 40% trisodium citrate dehydrate, trộn đều, ủ ở nhiệt độ phòng 5 phút, ly tâm ở tốc độ tối đa trong 2 phút và loại bỏ dịch nổi. Lặp lại bước rửa đến khi loại được phần lớn lớp chất béo trong sữa. Phần cặn được sử dụng để tách ADN tổng số sử dụng protocol cho vi khuẩn gram dương của bộ kit Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit. Nồng độ ADN được xác định bằng cách đo hấp thụ với máy nanodrop.

Với sữa chua, việc tách chiết cũng được thực hiện như với sữa tươi ngoại trừ bước ban đầu như sau: Cân 1 gram sữa chua cho vào ống 2 ml. Thêm 100 μL của 0,4 M NaOH + 75 μL của 40% trisodium citrate dehydrate, vortex, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút và ly tâm tốc độ tối đa trong 3 phút. Loại bỏ dịch nổi và tiến hành rửa và tách ADN như với các mẫu sữa ở trên. Nồng độ ADN được xác định bằng cách đo hấp thụ với máy nanodrop. Kết quả thu được được phân mềm tự động của máy tính ra nồng độ ADN theo $\text{ng}/\mu\text{L}$. Các mẫu ADN được lưu trữ trong tủ âm 20°C đến khi sử dụng để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.3. Chạy PCR và kiểm tra kết quả

Hỗn hợp phản ứng PCR được trộn như sau: 1x PCR buffer 22,5 μL , 10 pmol primer 0,5 μL mỗi loại, ADN khuôn 0,5 μL , nước vừa đủ 25 μL (EZ PCR mix, Phusa Biochem). Phản ứng PCR nhân bản gene đặc hiệu để nhận biết vi khuẩn được thực hiện trên máy chu trình nhiệt Applied Bioscience Veriti 96 giếng theo chương trình như sau: 1. Tiền biến tính 95°C trong 3 phút; 2. Biến tính 95°C trong 30 giây; 3. Gắn môi ở $52^\circ\text{C} \sim 57^\circ\text{C}$ trong 30 giây đến 50 giây tùy thuộc vào độ dài đoạn sản phẩm PCR; 4. Kéo dài chuỗi ở 72°C trong 40 giây; lặp lại các bước 2 đến bước 4 cho 30 đến 35 chu kỳ; và bước kéo dài chuỗi cuối cùng là 72°C trong 5 phút. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên thạch agarose 1% ở điện thế 100V trong thời gian 30 phút và kiểm tra kết quả bằng cách soi với đèn UV visualizer.

2.2.4. Khảo sát xây dựng quy trình phát hiện các vi khuẩn bằng phản ứng PCR

2.2.4.1. Khảo sát khả năng bắt cặp đặc hiệu của môi

Khả năng bắt cặp đặc hiệu của từng môi thiết kế cho từng loại vi khuẩn được đánh giá bằng cách chạy PCR của từng cặp môi với khuôn ADN của các loại vi khuẩn làm đối chứng kiểm định. Chẳng hạn như, khi kiểm tra độ đặc hiệu của môi dùng để phát hiện vi khuẩn *Listeria monocytogenes*, chúng tôi chạy PCR đồng thời của cặp môi này với các khuôn ADN của các chủng vi khuẩn khác như *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae O1*, *E. coli*, *Shigella* và tương tự như vậy đối với môi đặc hiệu cho các vi khuẩn *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* trong nghiên cứu này. Kết quả điện di sản phẩm PCR không xuất hiện các vạch dương tính khi sử dụng khuôn ADN của các vi khuẩn đối chứng kiểm định sẽ đánh giá được môi chỉ đặc hiệu cho từng vi khuẩn nhận biết đã thiết kế.

2.2.4.2. Khảo sát nồng độ ADN tối thiểu của các phản ứng PCR phát hiện *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* và *Listeria monocytogenes*

Sau khi tách chiết, nồng độ ADN ban đầu của các vi khuẩn *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* và *Listeria monocytogenes* lần lượt là: 77 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 39 $\text{ng}/\mu\text{L}$ và 68 $\text{ng}/\mu\text{L}$. ADN ban đầu được pha loãng giảm dần 10 lần theo thứ tự các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-9} và các nồng độ ADN sau khi pha loãng này được sử dụng để làm khuôn cho các phản ứng PCR với các cặp môi đặc hiệu riêng cho từng khuôn. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% ở 100V trong thời gian 30 phút. Nồng độ ADN tối thiểu cho phép phản ứng PCR phát hiện chủng vi



khuẩn được đánh giá ở nồng độ ADN thấp nhất vẫn xuất hiện vạch ADN dương tính trên bản gel điện di agarose 1%.

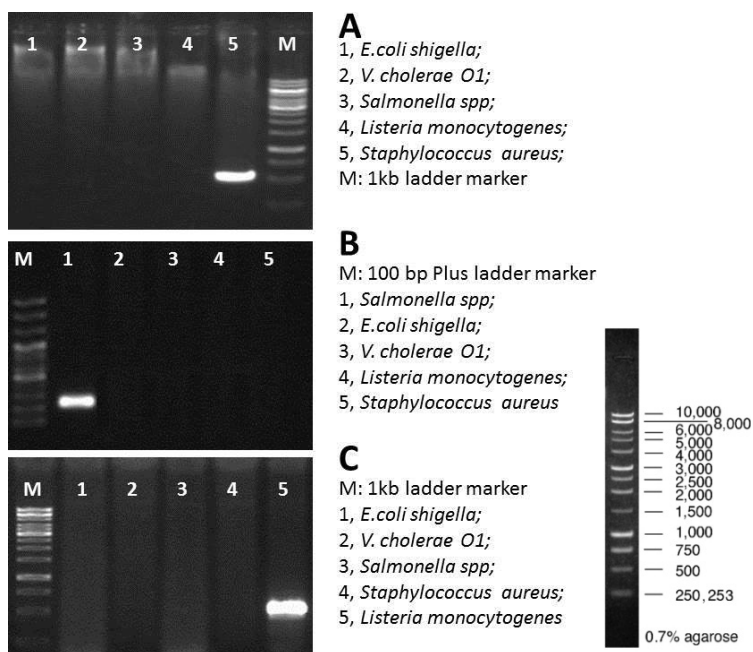
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá khả năng bắt cặp đặc hiệu của các cặp mồi

Sản phẩm PCR xuất hiện ở giếng số 5 (hình 1A và hình 1C), giếng số 1 (hình 1B) với một băng rõ nét có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR dự kiến (hình 1A: 476 bp cho *Staphylococcus aureus*, hình 1B: 257 bp cho *Salmonella spp.* và hình 1C: 519 bp cho *Listeria monocytogenes*). Đối với các giếng còn lại ở các hình 1A, 1B, và 1C khuôn ADN được sử dụng là các khuôn không đặc hiệu cho các cặp mồi Stanucf và Stanucr (hình 1A); SdiA1 và SdiA2 (hình 1B); và LL4R và LL5F (hình 1C) do đó không có băng sáng nào xuất hiện ở các giếng này. Kết quả thử nghiệm cho thấy cặp mồi Stanucf/r đặc hiệu nhận biết đối với khuôn ADN của vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, cặp mồi SdiA1/2 đặc hiệu cho khuôn DNA của vi khuẩn *Salmonella spp.* và cặp mồi LL4R/5F đặc hiệu cho khuôn ADN của vi khuẩn *Listeria monocytogenes*. Kích thước sản phẩm PCR dự kiến và kích thước thực tế so với thang ADN chuẩn trên bản điện di có hơi sai lệch do quá trình điện di có thể phụ thuộc cả vào cấu trúc 3 chiều của phân tử ADN cũng như thành phần của gel agarose chưa đồng nhất hoàn toàn ở một số vị trí.

3.2. Khảo sát nồng độ ADN tối thiểu của các phản ứng PCR nhận biết vi khuẩn *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* và *Salmonella spp.*

Nồng độ ADN khuôn của các phản ứng PCR giảm dần thì cường độ sáng của vạch ADN trên ảnh điện di cũng giảm dần (hình 2). Đối với *Staphylococcus aureus* nồng độ ADN giảm đến 39×10^{-4} ng/ μ L thì còn một băng mờ và không rõ nét, và đến 39×10^{-5} ng/ μ L thì không còn thấy xuất hiện băng nào nữa (giếng số 5 và 6 trên hình 2A). Như vậy, nồng độ ADN khuôn tối thiểu của vi khuẩn *Staphylococcus aureus* trong thí nghiệm này có thể nhận biết bằng phản ứng PCR là 39×10^{-4} ng/ μ L (hay 3,9 pg/ μ L). Dưới nồng độ này lượng ADN không đủ để tạo ra sản phẩm PCR có thể quan sát được trên bản gel điện di. Theo nghiên cứu của Gandra et al. [13], nồng độ ADN của *Staphylococcus aureus* được nhận biết bởi PCR là khoảng 1,63 pg/ μ L. Như vậy độ nhạy của phản ứng PCR của Gandra et al. hiệu quả cao hơn so với nghiên cứu này. Điều này có thể do độ tinh khiết của ADN trong phản ứng PCR của nghiên cứu này chưa cao.



Hình 1. Đánh giá khả năng bắt cặp đặc hiệu của các cặp mồi thiết kế để nhận biết *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* và *Listeria monocytogenes*.

ADN của các chủng vi khuẩn được tách chiết và sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với từng cặp mồi.

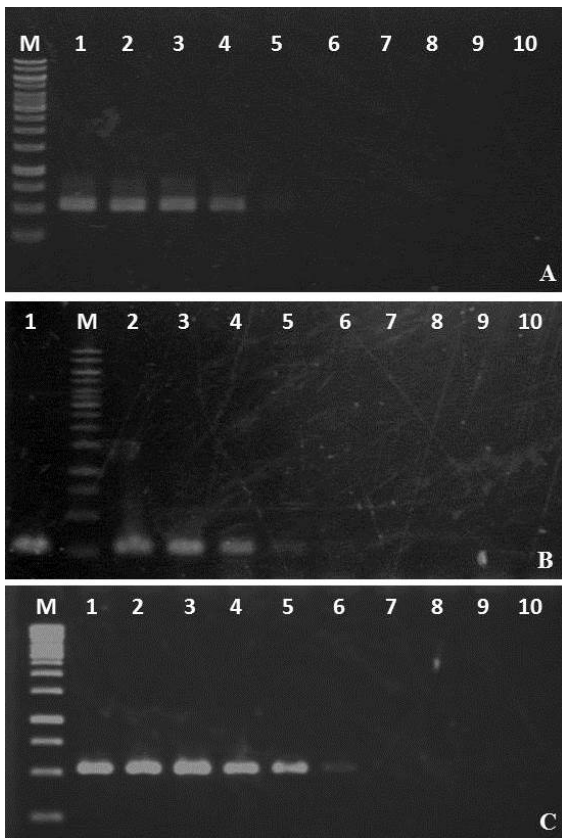
Hình A. Kết quả PCR sử dụng cặp mồi Stanucf và Stanucr với các mẫu ADN.

Hình B. Kết quả PCR sử dụng cặp mồi SdiA1 và SdiA2 với các mẫu ADN.

Hình C. Kết quả PCR sử dụng cặp mồi LL4R và LL5F với các mẫu ADN. M: 1Kb DNA ladder hoặc 100bp (hình bên phải).

Đối với phản ứng PCR trong đó ADN khuôn từ *Salmonella spp.*, nồng độ ADN mà ở đó vẫn xuất hiện một băng có thể nhìn thấy bằng mắt thường qua UV visualizer là ở độ pha loãng 77×10^{-5} ng/ μ L (0,77 pg/ μ L, giếng số 6 trên hình 2B). Ở nồng độ pha loãng hơn thì không quan sát được sự xuất hiện băng ADN. Do đó, nồng độ pha loãng tối thiểu của *Salmonella spp.* trong phản ứng 25 μ L trong thí nghiệm này là 0,77 pg/ μ L (hình 2B). Công bố của Moganedi et al. [14] với độ nhạy của phản ứng PCR nhận biết vi khuẩn *Salmonella spp.* là 0,3 pg/ μ L, trong khi với nhóm Radhika là 5 pg/ μ L [15] hay Kumar et al. là 3 pg/ μ L [16]. Như vậy, trong trường hợp nhận biết *Salmonella spp.* kết quả của chúng tôi nằm ở mức trung bình so với các công bố của các nhóm nghiên cứu này. So với hai nhóm sau thì thậm chí kết quả của chúng tôi tốt hơn [15,16].

Trong trường hợp sử dụng cặp môi LL4R/LL5F dùng để nhận biết vi khuẩn *Listeria monocytogenes*, nồng độ ADN mà ở đó vẫn xuất hiện băng có thể quan sát được trên bản gel agarose 1% là 68×10^{-5} ng/ μ L (0,68 pg/ μ L, giếng số 6 trên hình 2C). Ở nồng độ 68×10^{-6} ng/ μ L (giếng số 7 hình 2C) không xuất hiện băng nào có thể quan sát được bằng mắt thường. Như vậy ngưỡng phát hiện ADN khuôn tối thiểu của cặp môi LL4R/LL5F là 0,68 pg/ μ L trong phản ứng 25 μ L. Với công bố của nhóm Wang et al. [12], nồng độ ADN sau khi PCR mà tại đó vẫn xuất hiện băng sáng trên gel agarose là 25 pg/phản ứng 20 μ L. Như vậy thì trong thí nghiệm này, độ nhạy của phản ứng PCR của chúng tôi là vượt trội hơn so với công bố trên.



Hình 2. Khảo sát nồng độ ADN tối thiểu các phản ứng PCR nhận biết vi khuẩn *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* và *Salmonella spp.*

ADN của các chủng vi khuẩn được pha loãng theo loạt giảm dần 10 lần từ 10^1 đến 10^9 và sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với từng cặp môi đặc trưng.

Hình A. Kết quả PCR sử dụng cặp môi Stanucf và Stanucr với các mẫu ADN pha loãng của vi khuẩn *Staphylococcus aureus*.

Hình B. Kết quả PCR sử dụng cặp môi SdiA1 và SdiA2 với các mẫu ADN pha loãng của vi khuẩn *Salmonella spp.*

Hình C. Kết quả PCR sử dụng cặp môi LL4R và LL5F với các mẫu ADN pha loãng của vi khuẩn *Listeria monocytogenes*. M: 1Kb DNA ladder. Thứ tự mẫu từ 1 đến 10 theo thứ tự lần lượt như sau: 1, ADN không pha loãng, từ 2^{-10} , nồng độ pha loãng lần lượt từ 10^1 đến 10^9

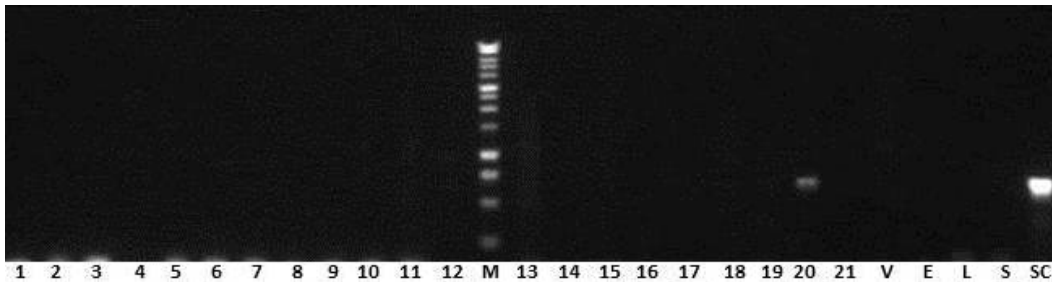
3.3. Nhận biết vi khuẩn *Listeria monocytogenes* trong sữa và sữa chua

Listeria monocytogenes là vi khuẩn có thể gây tử vong cho người nếu như nhiễm phải, đặc biệt là ở trẻ sơ sinh, phụ nữ mang thai, người già, và người bị suy giảm miễn dịch. Thế giới đã ghi nhận có những trận dịch lớn tại Mỹ hoặc Pháp làm chết nhiều người do ăn phải thức ăn bị nhiễm vi khuẩn này (8). Sữa chua tiệt trùng hay các sản phẩm làm từ sữa chua tiệt trùng cũng là một nguồn có khả năng nhiễm khuẩn gây bệnh. Với các kết quả tối ưu như trên, chúng tôi đã

Query	240	ATAATCAATTTTGGCACTTACATTTGGATAAGCTTGAGCATATTTTCATTCCATCTTTC	299
Sbjct	2269283	ATAATCAATTTTGGCACTTACATTTGGATAAGCTTGAGCATATTTTCATTCCATCTTTC	2269224
Query	300	CACTAATGTATTACTGCGTTGTTAACGTTTGATTAGTGGCATTTTTACAACGATTTT	359
Sbjct	2269223	CACTAATGTATTACTGCGTTGTTAACGTTTGATTAGTGGCATTTTTACAACGATTTT	2269164
Query	360	ATTGTCTTGATTAGTCATACCTGGCAAATCAATGCTGAGTGTTAATGAATCACGTTTTAC	419
Sbjct	2269163	ATTGTCTTGATTAGTCATACCTGGCAAATCAATGCTGAGTGTTAATGAATCACGTTTTAC	2269104
Query	420	AGGGAGAACATCTGGTTGATTTTCTACTAATTCGGAATTCGCTTTTACGAGAGCACCTGG	479
Sbjct	2269103	AGGGAGAACATCTGGTTGATTTTCTACTAATTCGGAATTCGCTTTTACGAGAGCACCTGG	2269044
Query	480	ATAGGTTA 487	
Sbjct	2269043	ATAGGTTA 2269036	

3.4. Nhận biết vi khuẩn *Staphylococcus aureus* trong sữa và sữa chua

Staphylococcus aureus hay tụ cầu vàng có thể gây nhiễm khuẩn tụ cầu. Nhiễm khuẩn tụ cầu có thể gây nguy hiểm đến tính mạng nếu vi khuẩn tụ cầu lưu thông trong máu. Khi ăn phải thức ăn nhiễm khuẩn này, người bệnh bị nôn mửa dữ dội và có thể bị sốt. Khả năng gây bệnh của vi khuẩn là do nó có thể sinh độc tố enterotoxin, là một protein bền nhiệt. Sữa và các sản phẩm từ sữa cũng chứa nguy cơ gây bệnh nếu như động vật cho sữa nhiễm bệnh hoặc quá trình chế biến sữa không an toàn. Trong nghiên cứu này, *Staphylococcus aureus* cũng là đối tượng để kiểm tra khả năng nhiễm của nó trong các mẫu sữa và sữa chua đã thu thập được.



Hình 4. Kết quả PCR với môi đặc hiệu cho *Staphylococcus aureus* Từ 1 đến 21, các mẫu sữa đã thu thập; *V. cholerae* O1; *E.coli*; *Shigella*; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella* spp.; *Staphylococcus aureus*; M: 1Kb DNA ladder của Thermo Scientific

Trong các mẫu sữa và sữa chua thu thập, chúng tôi phát hiện 01 mẫu có khả năng nhiễm khuẩn *Staphylococcus aureus* (giếng 20 trên hình 4). Mẫu này là mẫu sữa dê đã được thanh trùng của một trang trại nhỏ trên vùng Ba Vì, Hà Nội. Mẫu ADN này đã được khẳng định là ADN của vi khuẩn *Staphylococcus aureus* bằng cách đọc trình tự (Bảng 3). Việc nhiễm khuẩn *Staphylococcus aureus* này có thể là do quá trình chế biến đóng chai sữa không hoàn toàn đảm bảo vô trùng. Như vậy, nguy cơ bị ngộ độc thực phẩm khi tiêu thụ sữa này là hoàn toàn có thể xảy ra. Trong những năm gần đây, tình hình ngộ độc do uống sữa xảy ra cũng khá nhiều. Trong các nguyên nhân ngộ độc đã tìm được thì có cả sữa nhiễm vi khuẩn *Staphylococcus aureus* như: vụ ngộ độc sữa tại hai Trường Tiểu học ở Hậu Giang vào năm 2017 (10). Ngoài ra, riêng đến



hết tháng 10/2018, tụ cầu vàng được coi là “thủ phạm số 1” gây nên các vụ ngộ độc tập thể trên cả nước (11). Tóm lại, mặc dù sữa đã thanh trùng nhưng vẫn có khả năng nhiễm lại các loại vi khuẩn gây bệnh nếu như quá trình sau khi thanh trùng không đảm bảo; cần phải có các biện pháp kiểm soát nhằm đảm bảo an toàn cho người sử dụng sữa và các sản phẩm sữa từ các hộ chế biến kinh doanh nhỏ lẻ hiện nay.

Bảng 3. Trình tự ADN mẫu số 20 (hình 4) được BLAST trên NCBI *Staphylococcus aureus* strain GD1696 chromosome, complete genome Sequence ID: [CP040233.2](#) Length: 2801264 Number of Matches: 1 Range 1: 514573 to 515018 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
797 bits(431)	0.0	442/447(99%)	2/447(0%)	Plus/Minus
Query 1	GCCCCGATCCATATTTATCAGTTCTTTGACCTTTGTCAA-CTCGACTTCAATTTTCTTTG			59
Sbjct 515018	GCCACG-TCCATATTTATCAGTTCTTTGACCTTTGTCAAACGACTTCAATTTTCTTTG			514960
Query 60	CATTTTCTACCAAttttttCGTAAATGCACTTGCTTCAGGACCATATTTCTCTACACCTT			119
Sbjct 514959	CATTTTCTACCAATTTTTTCGTAAATGCACTTGCTTCAGGACCATATTTCTCTACACCTT			514900
Query 120	TTTTAGGATGCTTTGTTTCAGGTGTATCAACCAATAATAGTCTGAATGTCATTGGTTGAC			179
Sbjct 514899	TTTTAGGATGCTTTGTTTCAGGTGTATCAACCAATAATAGTCTGAATGTCATTGGTTGAC			514840
Query 180	CTTTGTACATTAATTTAACAGTATCACCATCAATCGCTTTAATTAATGTCGCAGGTTCTT			239
Sbjct 514839	CTTTGTACATTAATTTAACAGTATCACCATCAATCGCTTTAATTAATGTCGCAGGTTCTT			514780
Query 240	TATGTAATTTTTAGTTGAAGTTGCACTATATACTGTTGGATCTTCTGAACCACTTCTAT			299
Sbjct 514779	TATGTAATTTTTAGTTGAAGTTGCACTATATACTGTTGGATCTTCTGAACCACTTCTAT			514720
Query 300	TTACGCCATTATCTGTTTGTGATGCATTTGCTGAGCTACTTAGACTTGAAGCTACAAC			359
Sbjct 514719	TTACGCCATTATCTGTTTGTGATGCATTTGCTGAGCTACTTAGACTTGAAGCTACAAC			514660
Query 360	AAGTTAACACTAAGCAACTAGTAGCGAAAAAGAAAAAGCTTTGCGTATTGTTCTTTTCG			419
Sbjct 514659	AAGTTAACACTAAGCAACTAGTAGCGAAAAAGAAAAACCTTTGCGTATTGTTCTTTTCG			514600
Query 420	AAACATTACTGATAGCCATCCCGATAA		446	
Sbjct 514599	AAACATTACTGATAGCCATCCCTATAA		514573	

3.5. Nhận biết vi khuẩn *Salmonella spp.* trong sữa và sữa chua

Ngoài bệnh thương hàn và phó thương hàn gây nhiễm trùng máu, *Salmonella spp.* cũng là một loại vi khuẩn thường gây ngộ độc thực phẩm. Các triệu chứng do *Salmonella spp.* gây ra thường là tiêu chảy, nôn mửa và kéo dài từ 2 đến 7 ngày. Sữa chua tiệt trùng có thể là một nguồn nhiễm khuẩn này. Tất cả các mẫu sữa và sữa chua trong nghiên cứu này đã được kiểm tra bằng

PCR để phát hiện khả năng nhiễm khuẩn *Salmonella spp.* May mắn là trong tất cả các mẫu sữa và sữa chua đã thu thập, chúng tôi không phát hiện một trường hợp nào dương tính với vi khuẩn *Salmonella spp.* ngoại trừ đối chứng dương là DNA khuôn từ chính vi khuẩn *Salmonella spp.* (dữ liệu không thể hiện trong bài). Thí nghiệm này đã được lặp lại 03 lần và kết quả là đồng nhất. Như vậy, các mẫu sữa và sữa chua trong thí nghiệm này không chứa vi khuẩn *Salmonella spp.*

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết lập được phương pháp phát hiện nhanh vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* và *Salmonella spp.* bằng kỹ thuật PCR. Kết quả cho thấy các cặp môi đã thiết kế riêng cho từng vi khuẩn có độ đặc hiệu cao với các vi khuẩn. Nồng độ DNA tối thiểu trong phản ứng phát hiện các vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* và *Salmonella spp.* lần lượt là 3,9 pg/ μ l, 0,68 pg/ μ l và 0,77 pg/ μ l. Kết quả này cũng khá tương đồng với nhiều nghiên cứu đã công bố và đã được áp dụng để khảo sát sự có mặt của các vi khuẩn này trên các mẫu sữa và sữa chua thu thập.

Trong 49 mẫu thu thập tại các vùng gần Hà Nội đầu năm 2019, có 23 mẫu sữa chưa thanh trùng, 12 mẫu sữa đã thanh trùng và 14 mẫu sữa chua. Kết quả cho thấy có 01 mẫu sữa dê đã thanh trùng lấy tại Ba Vi, Hà Nội có khả năng nhiễm vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và 01 mẫu sữa tươi chưa thanh trùng lấy tại Gia Lâm, Hà Nội có khả năng nhiễm khuẩn *Listeria monocytogenes*. Tất cả các mẫu sữa và sữa chua đều âm tính với *Salmonella spp.* Các mẫu nhiễm khuẩn này đã được khẳng định bằng cách đọc kết quả giải trình tự gene. Từ kết quả này ta thấy quá trình xử lý sau khi thanh trùng sữa rất quan trọng để tránh nhiễm ngược lại vào sữa và có thể nhận thấy không nên sử dụng sữa chưa thanh trùng hay chưa tiệt trùng để đảm bảo sức khỏe người tiêu dùng. Như vậy, các nhà quản lý cần đưa ra các biện pháp phải lưu ý hơn để lấy mẫu kiểm tra giám sát thường xuyên các mẫu sữa và sản phẩm của sữa để phòng, tránh việc có thể xảy ra các vụ ngộ độc tập thể từ sữa và các sản phẩm của sữa không an toàn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Năm 2018 - Những nỗ lực của ngành Sữa Việt Nam (15/1/2019). Hiệp hội Sữa Việt Nam.
2. Otto Garcia et. al. (2006), "The Economics of Milk Production in Hanoi, Vietnam with Particular Emphasis on Small-scale Producers", *FAO, PPLPI Working Paper No.33*.
3. Nguyen Anh Phong, (2015), "Small holder involvement in Vinamilk supply chain, Vietnam", *FAO*
4. Mahendra Pal et. al. (2016), "Bacterial Contamination of Dairy Products", *Beverage & Food World*, 9 (43), 40 - 43.
5. Edward M. Fox et. al. (2017), "Editorial: Microbial Food Safety along the Dairy Chain", *Frontiers in Microbiology*, (8), 1612.
6. Jin-Qiang Chen et. al. (2017), "PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources", *Food Science and Human Wellness*, (6), 39 - 59.
7. Konstantia Halatsi et. Al, "PCR detection of *Salmonella spp.* using primers targeting the quorum sensing gene *sdIA*", *FEMS Microbiol Lett* 259 (2006), 201 - 207.
8. Joseph Odumeru. (2002), "Current Microbial Concerns in the Dairy Industry", *Food Safety magazine*.
9. Odd G. Brakstad et. al. (1992), "Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the nuc Gene", *Journal of Clinical Microbiology*, 7 (30), 1654 - 1660.
10. Thúy An (2017). Hậu Giang: Trẻ ngộ độc do uống sữa có vi khuẩn *Staphylococcus aureus*. Quân đội Nhân dân online 06/11/2017



11. Minh Nhật (2018). Cảnh báo về “thủ phạm” gây ra các vụ ngộ độc tập thể. daibieunhan-dan.vn online 16/12/2018
12. Yi Wang et. al. (2014), “Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* by cross-priming amplification of *lmo0733* gene”, *FEMS Microbiol Lett*, 361, 43 - 51.
13. Eliezer Avila Gandra et. al. (2016), “Detection by multiplex PCR of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* in artificially contaminated milk”, *Ciência Rural, Santa Maria*, v.46, n.8, 1418-1423
14. KLM Moganedi et. al. (2007), “Optimisation of the PCR-*invA* primers for the detection of *Salmonella* in drinking and surface waters following a pre-cultivation step”, *Water SA*, Vol. 33 No. 2.
15. M. Radhika et. al., “A novel multiplex PCR for the simultaneous detection of *Salmonella enterica* and *Shigella* species”, *Journal of Microbiology Online*, ISSN 1678 - 4405
16. Kumar S., Balakrishna K. & Batra H. (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”, *Letters in Applied Microbiology*, 2 (42), 149 - 154.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài được tài trợ chính từ quỹ học bổng cho cựu nghiên cứu viên của tổ chức JICA-KIRIN, Nhật Bản và Công ty Kirin, Nhật Bản.

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sâu sắc đến Tiến sĩ, Bác sĩ Vũ Thu Hằng, Đại học Y Thái Nguyên đã tặng chủng chuẩn *Staphylococcus aureus* và *E. coli shigella*; Bác sĩ Nguyễn Thái Sơn, Bệnh viện Quân Y 103 đã để lại cho chúng tôi chủng chuẩn *Listeria monocytogenes*; Thạc sĩ Lê Đình Duẩn, Công ty CP Công nghệ vi sinh và môi trường đã tặng chủng chuẩn *Salmonella spp.* và *Vibrio cholera O1* cho nghiên cứu; Tiến sĩ Nguyễn Phương Huệ, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp trong việc thu thập các mẫu sữa tươi tại các hộ cá thể tại hai xã Dương Hà và Phù Đổng, Gia Lâm, Hà Nội.

Summary

ASSESSMENT OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *SALMONELLA SPP.* CONTAMINATION IN DAIRY SAMPLES COLLECTED IN GIA LAM AND BA VI, HANOI EARLY 2019

Nguyen Thi Minh Huyen¹, Tran Thi Hoa¹, Ninh Thi Tuyet Lan¹, Tran Thi Hien²

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Faculty of Biology, VNU University of Science, National University, Hanoi Vietnam*

Milk and dairy products from dairy farms around Hanoi greatly contribute to the consumed milk quantity in Hanoi. The use of fresh milk or pasteurized milk becomes more and more popular in the daily life of local people. Milk and dairy products were widely sold in numerous stores, particularly in Xuan Mai, Ba Vi, Phu Dong and Gia Lam. However, there have not yet been any studies to assess the pathogenic bacterial contamination of these products. In our study, 49 samples including 23 raw milk samples, 12 pasteurized milk samples, and 14 yogurt samples were collected in order to examine the presence of food-borne pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* using PCR method. This fast and accurate method works based on the specific amplification of tested bacterial DNA. The results showed that one of the samples may contain *Staphylococcus aureus* while another may be contaminated with *Listeria monocytogenes*. None of the samples was contaminated with *Salmonella spp.* The results were confirmed by gene sequencing.

Keywords: Bacteria, food-poisoning, milk, bacterial contamination, Hanoi.