

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN NHANH VI KHUẨN *Salmonella* spp. TRÊN NỀN MẪU THỊT BẰNG PHƯƠNG PHÁP LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP)

Nguyễn Phạm Trúc Phương*, Đoàn Thị Quỳnh Hương
Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông Nghiệp Công Nghệ Cao

TÓM TẮT

Salmonella là một trong những vi khuẩn gây ra ngộ độc thực phẩm và phân lập ở hầu hết thực phẩm. Mục tiêu của nghiên cứu này là thiết lập được quy trình phát hiện nhanh vi khuẩn *Salmonella* spp. trên nền mẫu thịt bằng phương pháp Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) đặc hiệu với gen *invA*, đáp ứng yêu cầu ứng dụng phân tích. Kết quả nghiên cứu đã xây dựng được quy trình phân tích trực tiếp *Salmonella* từ mẫu thịt dựa trên phản ứng LAMP, bao gồm: (1) tăng sinh mẫu (25 g) trong môi trường (150 ml dung dịch đệm pepton: 75 ml canh thang RVS), trong thời gian 10 giờ trên nền mẫu thịt tươi; cải tiến phương pháp tách chiết nhanh thu DNA từ dịch tăng sinh mẫu thực phẩm đó là sử dụng đệm NaOH 100 mM, gia nhiệt 5 phút tại 95°C, siêu âm 30 giây, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 2 phút thu dịch DNA cho phản ứng LAMP. Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp được xây dựng có độ đặc hiệu (SP) đạt 94%; độ chính xác (AC) đạt 94%; độ nhạy (SE) đạt 100%; tỷ lệ âm tính giả 0% và tỷ lệ dương tính giả 6%, LOD₅₀ là 3 CFU/25g. Hiệu quả phân tích *Salmonella* bằng phương pháp LAMP được xây dựng tương đương với phương pháp nuôi cấy theo TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017) trên nền mẫu thịt nhưng có kết quả cho thời gian phân tích ngắn khoảng 10 giờ.

Từ khóa: *Salmonella*; LAMP; gen *invA*; ngộ độc thực phẩm; thịt

Ngày nhận bài: 09/6/2020; Ngày hoàn thiện: 31/7/2020; Ngày đăng: 31/7/2020

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

Nguyen Pham Truc Phuong*, Doan Thi Quynh Huong
Research & Development Center For High Technology Agriculture

ABSTRACT

Salmonella is the main pathogens that contaminate animal products and cause human *Salmonella* food poisoning. The objective of this study establish a rapid detection process for *Salmonella* spp. in meat samples by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method specific to *invA* gene, meeting the requirements of analytical applications. The results of the study have built direct analysis processes of *Salmonella* from food based on the Loop Mediated Isothermal Amplification reaction, including: (1) Take meat sample (25 gram) are enriched in 150 ml Buffer Pepton Water (BPW): 75 ml Rappaport Vassiliadis Soya Broth (RVS) in a period of 10 hours, prior to DNA extraction for LAMP; (2) To improve the method of rapid DNA extraction from food enrichment fluid that using 100 mM NaOH buffer (meat), 5 minutes heating at 95°C, 30 seconds ultrasound, 10.000 rpm/g centrifugation in 2 minutes of collection DNA for LAMP reaction. The results of evaluating of method show that the LAMP method have sensitivity (SE) is 100%, accuracy is (AC) 94%, specificity (SP) is 94%, the false positive rate is 6% and false negative rate is 0%. The above results indicate the LAMP has been set up and the standard method according to TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017) are equivalent for detection of *Salmonella* in meat, but the time for analysing of LAMP is shorter, only 10 hours.

Keywords: *Salmonella*; LAMP; *invA* gene; food poisoning; meat

Received: 09/6/2020; Revised: 31/7/2020; Published: 31/7/2020

* Corresponding author. Email: trucphuongnguyen1206@gmail.com

1. Giới thiệu

Theo Cơ quan An toàn Thực phẩm Châu Âu 2007, *Salmonella* spp. thuộc họ Enterobacteriaceae là một trong những nguyên nhân quan trọng gây ra nhiễm khuẩn trên thực phẩm ở các nước phát triển và đang phát triển; trong đó vi khuẩn *S. typhimurium* và *S. enteritidis* là hai kiểu huyết thanh quan trọng gây bệnh phổ biến cho người. 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. Gia cầm thường bị nhiễm bệnh thông qua việc tiêu thụ thức ăn bị nhiễm khuẩn, nhiễm khuẩn chéo trong nhà ấp trứng, hoặc trong quá trình giết mổ và chế biến. Dựa theo Tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN 7926 – 2008) vi sinh vật trong thực phẩm yêu cầu lượng *Salmonella* trong 25g là 0. Vì vậy, hiện nay có nhiều phương pháp được sử dụng để phát hiện nhóm vi khuẩn này.

Việc phát hiện bằng phương pháp nuôi cấy truyền thống bao gồm giai đoạn tăng sinh và kiểm tra sinh hóa thì cần thời gian từ 5 đến 7 ngày để cho kết quả. Trong khi, phương pháp phát hiện dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử như PCR, real time PCR.... thì cho kết quả kiểm tra nhanh và đặc hiệu hơn, thời gian phát hiện là 2 ngày. Tuy nhiên, phương pháp này yêu cầu các thiết bị sử dụng hiện đại và hóa chất đắt tiền [1]. Do đó, việc phát triển và ứng dụng phương pháp chẩn đoán nhanh, rút ngắn thời gian phát hiện, không đòi hỏi thiết bị đắt tiền và có thể được sử dụng để phát hiện vi khuẩn *Salmonella* là yêu cầu cấp thiết.

Kỹ thuật LAMP là phương pháp nhân bản DNA thông qua việc tổng hợp một đoạn DNA

lớn mà không cần các chu trình biến nhiệt [2]. Kỹ thuật này được ứng dụng để phát hiện virus, vi khuẩn, nấm và ký sinh trùng. Phương pháp này sử dụng 4 môi khác nhau được thiết kế đặc biệt để nhận ra 6 vùng riêng biệt trên gen đích và phản ứng diễn ra ở một nhiệt độ duy nhất. Quá trình tái bản và phát hiện gen đích chỉ diễn ra trong một bước duy nhất. Phương pháp này có hiệu quả khuếch đại cao khoảng 10^9 - 10^{10} lần trong 15- 60 phút. So với các phương pháp như PCR, real-time PCR,... kỹ thuật LAMP có ưu điểm: đơn giản, giá thành thấp và đặc biệt là thời gian thực hiện ngắn và có thể phát hiện kết quả bằng mắt thường. Kỹ thuật LAMP sẽ phù hợp cho hoạt động phát hiện ngoài phòng thí nghiệm cũng như các phòng thí nghiệm ít được trang bị hoặc các tổ chức thử nghiệm [3]. Trên thế giới kỹ thuật LAMP đã được ứng dụng để phát hiện một số vi khuẩn gây bệnh cho người trong thực phẩm đặc biệt trên nền mẫu thực phẩm. Do đó, nghiên cứu này hướng đến xây dựng quy trình phát hiện nhanh vi khuẩn *Salmonella* spp. trên nền mẫu thịt bằng kỹ thuật LAMP giúp nhận diện đoạn gen đặc hiệu *invA* để phát hiện gen gây độc của vi khuẩn *Salmonella* spp. trên nền mẫu thịt với độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu tương đương phương pháp nuôi cấy nhằm mở ra triển vọng về việc tìm kiếm phương pháp nhanh, hiệu quả hơn và tiết kiệm chi phí xét nghiệm các nhóm vi khuẩn này.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

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

Bảng 1. Chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên chủng	Số lượng	Nguồn gốc	Ký hiệu
1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> derived from ATCC® 51741™*	1	MicroBiologics	ATCC51741
2	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Abaetetuba</i> derived from Silliker® SLR156	1	MicroBiologics	SLR156
3	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Abony</i> derived from NCTC 6017	1	MicroBiologics	NCTC6017
4	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Anatum</i>	1	MicroBiologics	ATCC9270

STT	Tên chủng	Số lượng	Nguồn gốc	Ký hiệu
5	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis</i> derived from ATCC® 9270 ^{TM*} ;	1	MicroBiologics	ATCC10708
6	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis</i> derived from ATCC® 7001 ^{TM*} ;	1	MicroBiologics	ATCC7001
7	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B</i> derived from ATCC® 8759 ^{TM*} ;	1	MicroBiologics	ATCC 8759
8	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Poona</i> derived from NCTC 4840	1	MicroBiologics	NCTC 4840
9	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Pullorum</i> derived from ATCC® 13036 ^{TM*} ;	1	MicroBiologics	ATCC13036
10	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium</i> derived from ATCC® 25241 ^{TM*} ;	1	MicroBiologics	ATCC25241
11	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC1911	1	MicroBiologics	ATCC1911
12	<i>E.coli</i> ATCC 25922	1	MicroBiologics	ATCC25922
13	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1	MicroBiologics	ATCC 6538

Các cặp mồi sử dụng trong kỹ thuật LAMP được trình bày ở trong Bảng 2.

Bảng 2. Trình tự mồi được sử dụng trong nghiên cứu

Tên	Mồi	Trình tự (5' – 3')	Tham khảo
<i>invA-2</i>	FIP	gCgCggCATCCgCATCAATA- TgCCCggTAAACAGATgAgT	Chen và ctv, 2011 [4]
	BIP	gCgAACggCgAAgCgTACTg- TCgCACCGTCAAAggAAC	
	F3	CggCCCgATTTTCTCTgg	
	B3	CggCAATAgCgTCACCTT	
	LF	ggCCTTCAAATCggCATCAAT	
	LB	gAAAaggAAAgCCAgCTTTACg	
<i>Gen</i>	S139	GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA	Rahn và ctv (1991)
<i>invA</i>	S141	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	[5]

Mẫu sử dụng trong nghiên cứu: Thịt heo được thu nhận tại các chợ và siêu thị tại Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. TĂNG SINH: Cân 25g mẫu cho vào túi nilon vô trùng, thêm vào túi 225 ml môi trường gồm: 150 ml dung dịch đệm pepton (1,0% peptone; 0,5% NaCl; 0,35% Na₂HPO₄; 0,15% KH₂PO₄) và 75 ml canh thang RVS (0,45% sản phẩm thủy phân đậu tương bằng enzym; 0,8% NaCl; 0,06% KH₂PO₄; 0,04% K₂HPO₄; 2,9% MgCl₂.6H₂O; 0,0036% xanh malachit oxalat), đồng nhất trong 30 giây, ủ ở 37°C trong 10 giờ. Chuyển 1 ml dịch khuẩn vào ống eppendorf 1,5 ml để ly trích DNA dùng cho phân tích bằng kỹ thuật LAMP.

2.2.2. Xử lý dịch vi khuẩn và ly trích DNA: Dịch vi khuẩn trong eppendorf được ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 2 phút; loại bỏ phần nước; Huyền phù sinh khối được hòa trong 200µl NaOH 100 mM. Vortex để sinh khối được trộn đều dung dịch đệm và ủ ở nhiệt độ

95°C trong 5 phút. Sau đó, siêu âm mẫu trong 30 giây, ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 2 phút và thu dịch nổi. Dịch nổi được sử dụng làm khuôn DNA trong các phản ứng LAMP.

2.2.3. Thành phần phản ứng LAMP: Phản ứng LAMP được thực hiện ở thể tích là 25µl trong ống eppendorf 0,2 ml với thành phần như sau: 2,5 µl dung dịch đệm khuếch đại đẳng nhiệt II (Isothermal Amplification Buffer II) (10X); 1,5 µl MgSO₄ (100 mM); 1 µl Bst 3.0 polymerase (8,000 U/ml) (NEB, Mỹ); 1,4 µl dNTP Mix (25 mM) (Thermo ScientificTM, Lithuania); 4 µl Betaine (5M) (Sigma, Đức); 1 µl mồi FIP/BIP (40 µM) (IDT, Mỹ); 1 µl mồi F3/B3 (5 µM) (IDT, Mỹ); 1 µl mồi LoopF/B (10 µM) (IDT, Mỹ); 2 µl DNA tách chiết và bổ sung thêm nước cất (Invitrogen, Mỹ) để đủ 25 µl.

2.2.4. Chương trình phản ứng LAMP: Phản ứng xảy ra ở nhiệt độ 63°C, thời gian phản ứng là 60 phút trong bồn ủ nhiệt khô. Phản

ứng được kết thúc bằng cách tăng nhiệt độ lên 80°C trong 10 phút.

2.2.5. *Phân tích sản phẩm*: Hiệu quả khuếch đại của phản ứng LAMP được đánh giá bằng cách sử dụng chất chỉ thị màu hydroxy naphthol blue (HNB) (khi bổ sung HNB, nếu phản ứng LAMP diễn ra (dương tính), hỗn hợp phản ứng sẽ chuyển từ màu tím hoặc xanh đậm sang xanh da trời).

2.2.6. *Xác định Salmonella spp. bằng phương pháp nuôi cấy*: theo TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017) [6].

2.2.7. *Xác định giới hạn phát hiện LOD₅₀*: được thực hiện theo phương pháp Spearman-Kärber 50% Endpoint [7]. Chuẩn bị một dãy pha loãng nhị phân dịch vi khuẩn *S. enteritidis* ATCC 13036 từ mật độ ban đầu khoảng 0-50 CFU/ml. Hút 1ml mỗi dịch pha loãng để gây nhiễm vào 25g mẫu. Thực hiện 10 lần lặp lại cho một mật độ gây nhiễm. Phân tích mẫu gây nhiễm bằng phương pháp đã định. Giới hạn phát hiện (Limit of Detection- LOD₅₀) được tính theo công thức Spearman-Kärber như sau:

$$\log(\text{LOD}_{50}) = L - d(\sum P_i - 0.5) = m \text{ hay } \text{LOD}_{50} = 10^m$$

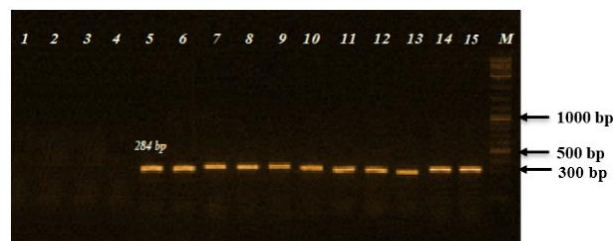
Trong đó: **LOD₅₀**: Giới hạn phát hiện của phương pháp; **L**: log của nồng độ DNA thấp nhất mà tại đó 100% số lần lặp lại phản ứng cho kết quả dương tính; **d**: log của hệ số nồng độ pha loãng ($d = \log_2$); **P_i**: Tỷ lệ mẫu cho kết quả dương tính nằm trong khoảng $50\% \leq P_i \leq 100\%$ tương ứng với với nồng độ pha loãng thứ i; **Um**: Ước lượng sai số của m, với $U_m = d^2 \sum (P_i(1 - P_i)) / (n - 1)$; **n**: Số lần lặp lại đối với nồng độ pha loãng thứ i (n=10)

2.2.8. *Xác định các thông số kỹ thuật của phương pháp*: Các thông số của phương pháp LAMP được xác định bao gồm: độ chọn lọc, độ chính xác, độ nhạy, độ đặc hiệu, tỉ lệ âm tính giả, tỉ lệ dương tính giả. Các thông số này được xác định dựa trên phương pháp nuôi cấy theo TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017) được thực hiện theo hướng dẫn xác nhận hiệu lực phương pháp định tính vi sinh vật tại ISO 16140:2003 [8].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Xác nhận 10 chủng vi khuẩn Salmonella sử dụng cho phản ứng LAMP là từ chủng khuẩn Salmonella spp.

10 chủng khuẩn *Salmonella* sử dụng trong nghiên cứu được hoạt hóa và tăng sinh ở 37°C trong (18 ± 2) giờ. Tiếp theo sẽ tiến hành ly trích DNA của 10 chủng *Salmonella* để phân tích bằng PCR sử dụng cặp mồi S139/S141 khuếch đại cho trình tự gen *invA*. Kết quả điện di ở hình 1 cho thấy sản phẩm khuếch đại trong phản ứng PCR thu được từ 10 chủng *Salmonella* đều có kích thước tương ứng với kích thước của chúng dương là DNA plasmid chứa trình tự gen *invA* ở nồng độ 10^3 bản sao (IDT, Mỹ) và phù hợp với trình tự gen mục tiêu *invA* được công bố bởi Rahn và đồng tác giả (1991) là 284 bp [5]. Trong khi, sản phẩm khuếch đại trong phản ứng PCR không xuất hiện từ các chủng vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC1911, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Như vậy, 10 chủng *Salmonella* được sử dụng làm nguồn để ly trích DNA để xây dựng quy trình trong nghiên cứu này.



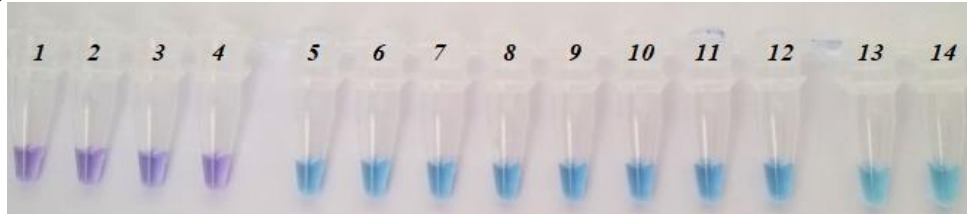
Hình 1. Kết quả khuếch đại gen *invA* bằng phản ứng PCR của các chủng vi khuẩn sử dụng cặp mồi S139/S141

1: đối chứng âm; 2,3,4: DNA từ chủng *L.monocytogenes* ATCC1911, *E.coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538; 5-14: DNA từ chủng *Salmonella* ATCC51741; *Salmonella* SLR156; *Salmonella* NCTC 6017; *Salmonella* ATCC9270; *Salmonella* ATCC10708; *Salmonella* ATCC7001; *Salmonella* ATCC8759; *Salmonella* NCTC 4840; *Salmonella* ATCC13036; *Salmonella* ATCC25241; 15: chủng dương; M: Thang DNA

3.2. Tính chuyên biệt của bộ mồi phát hiện gen *invA*

Để đánh giá tính chuyên biệt của bộ mồi trong việc phát hiện gen mã hóa cho *invA*, các

dòng vi khuẩn trong Bảng 1 đã được sử dụng. Kết quả hình 2 cho thấy, đối với bộ môi *invA2*, DNA ly trích từ 10 chủng *Salmonella* spp. đều có sự xuất hiện của sản phẩm LAMP ở ống 5 đến ống 15 thì phản ứng LAMP có màu xanh da trời. Trong khi, các mẫu DNA ly trích từ các chủng vi khuẩn *Listeria monocytogenes* ATCC1911, *E.coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 thì phản ứng LAMP sẽ hình thành màu tím (phản ứng âm tính) (tương ứng ống 1,2,3,4).



Hình 2. Kết quả khảo sát tính chuyên biệt của bộ môi *invA2*

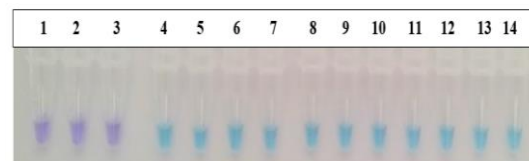
Ống 1: Đối chứng âm; Ống 2- 4: DNA từ chủng *L.monocytogenes* ATCC1911, *E.coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538; Ống 5- 14: DNA từ chủng *Salmonella* ATCC51741; *Salmonella* SLR156; *Salmonella* NCTC 6017; *Salmonella* ATCC9270; *Salmonella* ATCC10708; *Salmonella* ATCC7001; *Salmonella* ATCC8759; *Salmonella* NCTC 4840; *Salmonella* ATCC13036; *Salmonella* ATCC25241

Như vậy, bộ môi *invA2* chỉ cho sản phẩm khuếch chuyên biệt với các chủng *Salmonella* spp., không cho tín hiệu khuếch đại với các vi khuẩn *L.monocytogenes* ATCC1911, *E.coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538. Bộ môi *invA2* chỉ cho tín hiệu khuếch đại với những chủng *Salmonella* spp. có mang gen *invA*. Gen *invA* có vai trò trong việc xâm nhiễm vào tế bào biểu mô được chứng minh có mặt rộng rãi trong 245 chủng *Salmonella* spp. khác nhau được phân lập từ người, gà, nước thải [9], [10].

3.2. Xây dựng phương pháp phát hiện *Salmonella* spp. dựa trên phản ứng LAMP với bộ môi *invA2* khuếch đại gen *invA*

Gen *invA* hiện diện trên hầu hết các chủng *Salmonella* spp. nên phần lớn các xét nghiệm *Salmonella* đều sử dụng gen mục tiêu này để thiết kế các môi. Do đó, trong nghiên cứu này để phát hiện được phần lớn các chủng *Salmonella* spp., bộ môi *invA2* để phát hiện gen *invA* trong phản ứng LAMP đã được sử dụng. Kết quả phản ứng LAMP với DNA ly trích từ 10 chủng khuẩn *Salmonella* thì đều có sự thay đổi màu hỗn hợp phản ứng (chuyển từ màu tím sang màu xanh da trời), mẫu đối chứng âm không làm thay đổi màu hỗn hợp phản ứng. Điều đó cho thấy phản ứng LAMP thiết lập đã khuếch đại trình tự mục tiêu gen *invA*.

Trên cơ sở khả năng khuếch đại chuyên biệt đoạn gen *invA* của phản ứng LAMP đã thiết lập, quy trình phát hiện *Salmonella* spp. trên nền mẫu thịt đã được thiết lập. Kết quả phân tích được xác định là dương tính với *Salmonella* khi có sự thay đổi màu hỗn hợp phản ứng (chuyển từ màu tím hoặc màu xanh đậm sang màu xanh da trời). Kết quả phân tích trong mẫu được xác định là âm tính với *Salmonella* khi không có sự thay đổi màu hỗn hợp phản ứng (màu tím hoặc màu xanh đậm). Để đảm bảo độ tin cậy của quy trình phát hiện, trong mỗi lần phân tích phải có các mẫu đối chứng âm và đối dương với *Salmonella* đi kèm. Mẫu đối chứng dương là mẫu có chứa *Salmonella*.



Hình 3. Kết quả phản ứng LAMP để phát hiện vi khuẩn *Salmonella* spp.

Ống 1- 3: mẫu đối chứng âm; Ống 4- 14: DNA từ chủng *Salmonella* ATCC51741; *Salmonella* SLR156; *Salmonella* NCTC 6017; *Salmonella* ATCC9270; *Salmonella* ATCC10708; *Salmonella* ATCC7001; *Salmonella* ATCC8759; *Salmonella* NCTC 4840; *Salmonella* ATCC13036; *Salmonella* ATCC25241

3.3. Xác định các thông số kỹ thuật của quy trình LAMP được thiết lập

3.3.1 *Xác định giới hạn phát hiện LOD₅₀*: Các thí nghiệm để xác định LOD₅₀ được thực hiện với 50 mẫu thịt heo tươi, các mẫu này đã được xác định âm tính với *Salmonella* spp. Chủng *Salmonella enteritidis* ATCC 13036 được sử dụng để gây nhiễm vào các mẫu đã chuẩn bị với các mật độ khác nhau. Kết quả phát hiện *Salmonella* spp. trong các mẫu đã gây nhiễm được trình bày trên Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xác định giới hạn phát hiện LOD₅₀ của phương pháp

Mật độ vi khuẩn nhiễm trong 25g (CFU)	Hệ số pha loãng	Số lần lặp lại	Thịt heo	
			Số lần cho kết quả dương tính	Tỉ lệ dương tính
10	2	10	10	1
6	2	10	9	0,9
4	2	10	7	0,7
3	2	10	5	0,5
2	2	10	4	0,4

Bảng 4. Kết quả xác định các thông số kỹ thuật của phương pháp LAMP phát hiện *Salmonella* spp. nhiễm trên nền mẫu thịt heo tươi so với phương pháp nuôi cấy theo TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017)

Nền mẫu	Độ đặc hiệu (%)	Độ nhạy (%)	Độ chính xác (%)	Tỉ lệ âm tính giả (%)	Tỉ lệ dương tính giả (%)
Thịt heo tươi	92	100	92	0	8
Yêu cầu(*)	≥ 90	≥ 90	≥ 90	≤ 10	≤ 10

(*) Tham chiếu theo Viện Kiểm Nghiệm An Toàn Thực Phẩm Quốc Gia

Giới hạn phát hiện LOD₅₀ được xác định như sau: LOD₅₀ trung bình là 3 CFU/25g thịt heo, với độ tin cậy 95%, giá trị LOD₅₀ của phương pháp dao động trong khoảng 3-4 CFU/25g mẫu. Kết quả nghiên cứu này có độ nhạy gần tương đương với kết quả nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật LAMP phát hiện nhanh *Salmonella* trong sản xuất của Yang và đồng tác giả (2015) với độ nhạy từ 1,1-2,9 CFU/25 g [11].

3.3.2 Xác định các thông số kỹ thuật của phương pháp

Các thông số của kỹ thuật được xác định cho nhóm mẫu thịt. Nhóm mẫu được thực hiện trên 25 mẫu gây nhiễm *Salmonella enteritidis* ATCC 13036 và 25 mẫu không gây nhiễm nhóm vi sinh vật này. Mật độ gây nhiễm trong khoảng 5–10 CFU/25g. Kết quả đánh giá trung bình cho các nhóm mẫu được trình bày trong Bảng 4.

Kết quả Bảng 4 cho thấy các thông số kỹ thuật nói trên của phương pháp LAMP cho thấy chúng hoàn toàn đáp ứng yêu cầu của phương pháp phân tích tiêu chuẩn. Thời gian

cho kết quả phân tích bằng phương pháp LAMP trong vòng 10 giờ. Đây là cơ sở kỹ thuật để triển khai áp dụng phương pháp LAMP đến các phòng thí nghiệm phân tích *Salmonella* nhiễm trên mẫu thịt.

4. Kết luận

Đã xây dựng thành công quy trình phát hiện vi khuẩn *Salmonella* trong thực phẩm bằng phản ứng LAMP khuếch đại đoạn gen mục tiêu *invA*. Quy trình được thiết lập với các thông số cơ bản sau: Thời gian tăng sinh trong 150 ml dung dịch đệm pepton và 75 ml canh thang RVS là trong 10 giờ, dịch tăng sinh được ly trích DNA trong đệm NaOH 100 mM, gia nhiệt 5 phút tại 95°C, siêu âm 30 giây, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 2 phút và khuếch đại với bộ mồi *invA2*. Kết quả đánh giá hiệu lực quy trình LAMP so với phương pháp nuôi cấy theo TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017) cho thấy: độ đặc hiệu tương đối (SP) đạt 94%; độ chính xác tương đối (AC) đạt 94%; độ nhạy tương đối (SE) đạt 100%; tỷ lệ âm tính giả 0% và tỷ lệ dương tính giả 6%, LOD₅₀ là 2CFU/25g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. P. A. Kokkinos, P. G. Ziros, M. Bellou, A. Vantarakis, "Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Detection of *Salmonella* in Food," *Food Analytical Methods*, vol. 7, pp. 512-526, 2014.
- [2]. T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase, "Loop-mediated isothermal amplification of DNA," *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 12, p. 7, 2000.
- [3]. C. C. Boehme, P. Nabeta, G. Henostroza, R. Raqib, Z. Rahim, and M. Gerhardt, "Operational feasibility of using Loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of Pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, pp. 1936-1940, 2007.
- [4]. S. Chen, F. Wang, J. C. Beaulieu, R. E. Stein, and B. Ge, "Rapid detection of viable *Salmonellae* in produce by coupling propidium monoazide with Loop-mediated isothermal amplification," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 12, pp. 4008-4016, 2011.
- [5]. K. Rahn, S. A. De Grandis, R. C. Clarke, S. A. McEwen, J. E. Galan, C. Ginocchio, R. 3rd. Curtiss, and C. L. Gyles, "Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella Typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*," *Molecular and Cellular Probes*, vol. 6, no. 4, pp. 271-279, 1992.
- [6]. TCVN 10780-1:2017 (tham khảo ISO 6579-1:2017), Microorganisms in the food chain - Methods of detection, quantification and determination of serum serotypes of *Salmonella* - part 1: method for detection of *Salmonella* spp, National Standard.
- [7]. M. A. Ramakrishnan, "Determination of 50% endpoint titer using a simple formula," *World Journal of Virology*, vol. 5, no. 2, pp. 85-86, 2016.
- [8]. ISO 16140:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs- Protocol for the validation of alternative methods, *International Organization for Standardization*.
- [9]. J. E. Galan, C. Ginocchio, and P. Costeas, "Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family," *Journal of Bacteriology*, vol. 174, no. 13, pp. 4338-4349, 1992.
- [10]. M. E. Ohl, and S. I. Miller, "Salmonella: A model for bacterial pathogenesis," *Annual Review of Medicine*, vol. 52, pp. 259-274, 2001.
- [11]. Q. Yang, F. Wang, K. L. Jones, J. Meng, W. Prinyawiwatkul, and B. Ge, "Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the rapid, reliable, and robust detection of *Salmonella* in produce," *Food Microbiology*, vol. 46, pp. 485-493, 2015, doi: 10.1016/j.fm.2014.09.011.