

NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG KỸ THUẬT MULTIPLEX PCR TRONG PHÁT HIỆN VI KHUẨN *Salmonella* sp. VÀ *Staphylococcus aureus* GÂY NGỘ ĐỘC THỰC PHẨM

Nguyễn Thành Luân*, Lương Thị Hiếu, Cao Nguyễn Khánh Linh

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: luannt@cntp.edu.vn

Ngày nhận bài: 13/5/2018; Ngày chấp nhận đăng: 06/3/2019

TÓM TẮT

Việc phát hiện và định danh vi sinh vật trong thực phẩm nhằm nhanh chóng phát hiện các nguyên nhân gây ngộ độc thực phẩm và ngăn ngừa một cách có hiệu quả các tác hại từ ngộ độc thực phẩm là thực tế và cấp thiết. Tuy nhiên, các phương pháp nuôi cấy hiện nay chủ yếu là truyền thống, tốn nhiều thời gian, phức tạp và độ đặc hiệu chưa cao. Kỹ thuật multiplex PCR ứng dụng nhanh chóng và đơn giản, có độ nhạy cao và đồng thời khuếch đại đồng thời hai hay nhiều chuỗi gen trong phản ứng tương tự nhằm phát hiện một loạt các tác nhân gây bệnh chỉ trong một phép phân tích. Kết quả nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình phát hiện nhanh vi khuẩn *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* bằng kỹ thuật multiplex PCR có tiềm năng rất lớn trong xác định mẫu thực phẩm nhiễm khuẩn. Phản ứng tối ưu cho multiplex PCR được nghiên cứu và lựa chọn ở thể tích 25 μ L với 2,5 μ L 10X PCR buffer, 1,5 μ L 25 mM MgCl₂, 3 μ L 2,5 mM dNTPs; 1 μ L mỗi mồi *invA*; 2 μ L mỗi mồi *nuc*; 10 μ L DNA khuôn và 1,8 μ L dH₂O. Độ nhạy của phản ứng Multiplex PCR được xác định với mật độ 3×10^2 CFU/mL đối với *Salmonella* sp. và 7×10^1 CFU/mL đối với *Staphylococcus aureus* được thực hiện trong thời gian tăng sinh cần thiết của các mẫu thực phẩm nghi ngờ. Mẫu thực phẩm nhiễm *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* với 1 CFU/ 25 g mẫu được tiên hành sau 14 giờ nuôi cấy. Việc đánh giá các đặc hiệu của nghiên cứu này cho các nhóm vi khuẩn khác trong nhóm vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm cũng cần được phát triển ở những nghiên cứu rộng và đa dạng hơn về các loại thực phẩm dễ nhiễm khuẩn.

Từ khóa: *invA*, multiplex PCR, ngộ độc thực phẩm, *nuclease*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*.

1. MỞ ĐẦU

Đảm bảo chất lượng và an toàn thực phẩm đang là mối quan tâm đặc biệt đối với Việt Nam và trên thế giới. Các loại thực phẩm như thịt động vật, gia cầm, trứng và các sản phẩm sữa bán ở các chợ và cửa hàng lại không đảm bảo được chất lượng vệ sinh. Theo số liệu thống kê của Cục An toàn Vệ sinh Thực phẩm trong quý 1 năm 2018, khi thanh tra gần 160.000 cơ sở sản xuất và phân phối thực phẩm đã phát hiện hơn 31.000 cơ sở vi phạm với tổng số tiền hơn 20 tỷ đồng, đình chỉ hoạt động hơn 72 cơ sở, cấm lưu hành hơn 228 loại thực phẩm, tiêu hủy hơn 1.500 loại thực phẩm không đảm bảo chất lượng. Trong năm 2018, Việt Nam đã xảy ra 10 vụ ngộ độc thực phẩm làm 972 người mắc, trong đó 726 người phải nhập viện và đã có 4 trường hợp tử vong trong đó nhiều nhất là nhóm vi khuẩn cơ hội ký sinh từ vi khuẩn Gram âm và Gram dương chiếm hơn 40% các ca ngộ độc thực phẩm [1]. Bên cạnh đó, các thói quen sinh hoạt, ăn uống cũng như chế biến thực phẩm hiện nay chủ yếu diễn ra tại các quy mô chợ dân sinh hoặc việc đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm còn thô sơ làm cho nguy cơ tạp nhiễm khi chế biến bùng phát trong những năm gần đây [1].

Trong các nguy cơ tạp nhiễm cao, các nhóm vi khuẩn có thể nhiễm nhiều nhất là *Campylobacter*, *Salmonella*, *Coliforms*, *Escherichia coli*, *Vibrio* spp., *Staphylococcus* sp. thường được chú ý vì sự xuất hiện thường xuyên của chúng trong các nhiễm khuẩn từ thực phẩm. Đặc biệt nhóm vi khuẩn *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* là 2 vi khuẩn điển hình cho Gram âm và Gram dương gây bệnh phổ biến hiện nay và nguy cơ cao trong việc kháng kháng sinh trong điều trị các bệnh truyền nhiễm [2]. Nhiều nghiên cứu về tình trạng kháng kháng sinh và gây tử vong cao khi nhiễm độc vi khuẩn *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* được các đánh giá nhiễm bệnh ở các bệnh viện cũng như truyền nhiễm chéo [2, 3]. Bên cạnh đó, các nhóm tiêu chuẩn Việt Nam và quốc tế đều quy định nghiêm ngặt cho việc sản xuất, đóng gói, bảo quản cũng như xuất khẩu hiện nay đều chú trọng việc đánh giá tình trạng mẫu có tồn tại sự hiện diện của 2 nhóm vi khuẩn này [3]. Một trong những lý do được xác định là khả năng gây ngộ độc và độc tính của những loài vi khuẩn này có khả năng ảnh hưởng đến sức khỏe con người và vật nuôi và trực tiếp hấp thu qua đường tiêu thụ thực phẩm. Việc phát hiện sự hiện diện của vi khuẩn này chỉ được quan tâm khi có tình trạng gây bệnh diễn ra hoặc được cấp cứu ở trình trạng nguy kịch cho sức khỏe vật chủ. Vì vậy, việc cần phát triển một kỹ thuật có thể giúp phát hiện nhanh sự có mặt của nhóm vi khuẩn này cũng như cho kết quả thay thế kiểm nghiệm sinh hóa truyền thống sẽ giúp ích rất nhiều cho liệu pháp điều trị về sau cũng như biện pháp phòng tránh nếu phát hiện chúng trong mẫu thực phẩm [3].

Trong sự phát triển của sinh học phân tử, các vùng gen đặc hiệu để phát hiện các loại vi sinh vật gây bệnh, đặc biệt các vi khuẩn thuộc chi *Salmonella* sp. và loài *Staphylococcus aureus* đã được nghiên cứu và ứng dụng trong việc xác định bộ KIT định danh nhanh cho các loài bằng cặp môi đặc hiệu thông qua việc khuếch đại DNA nhanh bằng enzyme polymerase qua phản ứng PCR [2]. Các kỹ thuật sinh học phân tử nhờ vậy đã được ứng dụng nhiều trong việc phát hiện nhanh các tác nhân gây bệnh dựa trên các dấu hiệu phân tử mang tính đặc hiệu của loài [2]. Kỹ thuật PCR hiện nay được ứng dụng nhiều nhất trong các xét nghiệm vi sinh các mẫu bệnh phẩm từ các dịch máu, nước tiểu, đờm và các đánh giá miễn dịch khác [2, 3]. Những ứng dụng này thường được đánh giá thao tác nhanh chóng, chính xác và đơn giản. Tuy nhiên, kỹ thuật PCR truyền thống thường mất nhiều công sức trong thiết kế phản ứng và chỉ khuếch đại được một đoạn gen của một loại vi khuẩn nhất định. Điều đó gây hạn chế trong việc xác định nguyên nhân gây ngộ độc thực phẩm và trả kết quả nhanh nhất khi phát hiện bệnh cũng như đưa ra liệu pháp điều trị cho bệnh nhân ngộ độc thực phẩm [4]. Kỹ thuật multiplex PCR có độ nhạy cao và đồng thời khuếch đại hơn 2 chuỗi gen trong phản ứng tương tự, nó đã được sử dụng để phát hiện một loạt các tác nhân gây bệnh chỉ trong một phép phân tích [5, 6]. Từ khi có những nghiên cứu khuếch đại DNA bằng PCR, phương pháp multiplex PCR đã từng được mô tả và áp dụng thành công trong rất nhiều nghiên cứu liên quan đến DNA gồm có phân tích mất đoạn, đột biến, đa hình. Kỹ thuật multiplex PCR hiện được nghiên cứu và ứng dụng nhiều trong việc xác định các gen kháng kháng sinh của nhiều vi khuẩn gây bệnh đường ruột tiêu biểu như loài *Escherichia coli* O157:H7 trong y học miễn dịch [2]. Nghiên cứu của Freitas và cộng sự năm 2010 đã sử dụng multiplex PCR để phát hiện nhanh và trực tiếp sự hiện diện của vi khuẩn *Salmonella enteritidis* và *Salmonella typhimurium* xuất hiện trong thịt gia cầm thông qua gen xâm lấn *invA* [4]. Do đó, nghiên cứu này hướng đến xây dựng quy trình phát hiện nhanh vi khuẩn *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* bằng kỹ thuật multiplex PCR nhằm tìm kiếm phương pháp tối ưu sử dụng 2 môi đặc hiệu tối ưu nhận diện đoạn gen đặc hiệu *invA* và *nuclease (nuc)* để phát hiện gen gây độc của 2 loài vi khuẩn *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus*. Qua đó, kết quả này 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. Bên cạnh đó, việc tìm ra ngưỡng phát hiện tối ưu các loài vi khuẩn này cũng được chú trọng trong kỹ thuật multiplex PCR.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Các loài vi sinh vật nghiên cứu

Hai loài vi khuẩn *Salmonella sp.* và *Staphylococcus aureus* được phân lập và chọn lọc từ nhóm thực phẩm tươi sống như thịt gà, thịt bò, trứng gà, sò huyết chọn lọc từ nghiên cứu phân lập trong các thử nghiệm khẳng định qua giải mã trình tự rRNA 16S tương ứng *Salmonella enterica* trên công cụ BLAST của NCBI dựa trên nghiên cứu của de Freitas và cộng sự (2010) [4]. Vi khuẩn *Salmonella* và *Staphylococcus aureus* được chọn lọc qua quan sát hình thái và nhuộm Gram. Sau đó, tế bào vi khuẩn được chọn lọc thông qua phản ứng thử nghiệm sinh hóa và phản ứng coagulase cao nhất. Tế bào tiếp tục được sử dụng để nghiên cứu được phá vỡ nhanh bằng sốc nhiệt dựa trên nghiên cứu của Meng và cộng sự năm 1996 trong tách chiết DNA vi khuẩn *Escherichia coli* O157:H7 [7] với lượng sinh khối vi khuẩn sử dụng, được tăng sinh trong vòng 16-24 giờ trong môi trường dinh dưỡng LB (Luria – Bertani), 1 mL sinh khối sau tăng sinh được ly tâm ở vận tốc 14.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ dịch nổi, bổ sung 100 µL TE 1X và vortex đều, đem đi ủ ở 95 °C trong 10 phút, sau đó vortex, ủ trong đá ở 4 °C 5 phút và cuối cùng ly tâm ở vận tốc 12.000 vòng/phút trong 5 phút. DNA ở dịch nổi được thu nhận và bảo quản với TAE 1X ở -20 °C trước khi tiến hành các bước xác định định lượng và định tính DNA. DNA tổng số được kiểm tra độ tinh sạch và được định lượng bằng phương pháp đo mật độ quang (Optical Density) ở bước sóng hấp phụ 260 nm và 280 nm [7].

Nồng độ DNA được tính toán theo công thức sau:

$$C_{DNA} \text{ (ng/}\mu\text{L)} = OD_{260nm} \times 50 \times \text{độ pha loãng}$$

2.2. Các cặp mồi cho phản ứng PCR

Nghiên cứu này sử dụng 2 cặp mồi bao gồm cặp mồi *invAF- invAR* đặc hiệu cho gen *invA* đóng vai trò trong quá trình xâm nhiễm từ tế bào biểu mô ruột vào tế bào nhu động ruột của vi khuẩn *Salmonella*. và cặp mồi *nucF- nucR* đặc hiệu cho gen *nuc* mã hoá nuclease chịu nhiệt ở *Staphylococcus aureus*. Trong đó, các mồi *invAF- invAR*, *nucF – nucR* được chọn lựa và tối ưu theo nghiên cứu của những tác giả đã thực hiện các nghiên cứu về 2 loài vi khuẩn *Salmonella sp.* và *Staphylococcus aureus* dựa trên thiết kế mồi mô phỏng từ phần mềm Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) [5, 8, 9]. Trình tự mồi được đặt sản xuất tại công ty Integrated DNA Technologies, Mỹ (www.IDTDNA.com) theo trình tự các cặp mồi trong nghiên cứu với sản phẩm dự kiến khuếch đại ở 284 bp và 439 bp (Bảng 1). Thang chuẩn được sử dụng trong đề tài là thang chuẩn 1 kbp từ hãng IDT (www.idtdna.com) (Hình 2).

Bảng 1. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Gen mục tiêu	Tên mồi	Trình tự nucleotide cho phản ứng (5' → 3')	% GC	Tm (°C)	Kích thước sản phẩm PCR dự kiến	Công trình nghiên cứu tham khảo
<i>invA</i>	<i>invA-F</i>	GTGAAAGTATCGCCACGTTCTGGGCAA	50%	61,8 °C	284	Trần Thị Xuân Mai, (2011) [5] Rahn <i>et al.</i> (1992) [8]
	<i>invA-R</i>	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	52,4%	57,8 °C		
<i>nuc</i>	<i>nuc-F</i>	TTCAAGTCTAAGTAGCTCAGCA	40,91%	54,3 °C	439	Sasaki <i>et al.</i> (2010) [9]
	<i>nuc-R</i>	GCCACGTCCATATTTATCAGTTC	43,48%	55,1 °C		

Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu được thử nghiệm khả năng khuếch đại vùng DNA khuôn bằng phản ứng PCR 30 chu kỳ trong thể tích 25 μL gồm giai đoạn biến tính ban đầu (95 °C trong vòng 7 phút), giai đoạn khuếch đại 30 chu kỳ (gồm các bước biến tính 94 °C trong 30 giây, gắn mồi: 55 °C trong 30 giây, kéo dài mồi: 72 °C trong 30 giây), giai đoạn kéo dài cuối cùng (điều kiện nhiệt độ 72 °C trong vòng 5 phút) và giai đoạn ủ và bảo quản (ở điều kiện nhiệt độ 4 °C) với các thành phần tham gia phản ứng gồm hỗn hợp dung dịch PCR 10X buffer 10 mM, 25 mM MgCl_2 , 2,5 mM dNTPs buffer, 10 μM mồi xuôi và mồi ngược nhận diện 2 nhóm gen *invasive* và *nuclease*, 5 U/ μL *Taq* DNA polymerase và 5 μL DNA khuôn của mỗi loài vi khuẩn. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong dung dịch đệm TAE 0,5X ở hiệu điện thế 100 V trong vòng 30 phút sử dụng thang chuẩn 1kbp của IDT (www.idtdna.com). Sau đó, kết quả điện di trên gel sẽ được xác định qua máy đọc Geldoc ở bước sóng 312 nm với tia UV trên máy đọc gel Quantum-ST4 3000, Pháp [12].

2.3. Khảo sát xây dựng quy trình phát hiện nhanh và đồng thời *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* bằng phản ứng multiplex PCR

2.3.1. Khảo sát khả năng bắt cặp đặc hiệu của mồi

Kỹ thuật PCR đã được sử dụng nhằm thử nghiệm độ đặc hiệu của mồi với các chủng vi khuẩn *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* thuần chủng. Độ đặc hiệu được đánh giá bằng sự hình thành phản ứng PCR với từng loại mồi đặc hiệu nhận diện gen *invA* và gen *nuc* với kích thước phù hợp khi sử dụng khuôn cùng với DNA của 2 chủng *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus*. Kết quả điện di kiểm tra kết quả PCR khẳng định không xuất hiện vạch dương tính khi sử dụng khuôn DNA của vi khuẩn *Escherichia coli* đối chứng kiểm định nhằm đánh giá được mồi chỉ đặc hiệu cho 2 nhóm gene của 2 loài vi khuẩn định danh cũng như đặc hiệu chỉ cho duy nhất 1 loại mồi nhận diện cho nhóm gen ở mỗi loài vi khuẩn.

2.3.2. Khảo sát nồng độ DNA tối thiểu của các phản ứng PCR đơn, phát hiện riêng lẻ *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus*

Dung dịch DNA tổng số sau khi tách chiết từ các chủng vi khuẩn được lựa chọn ở các nồng độ khác nhau từ nồng độ pha loãng 10^{-1} đến 10^{-9} tương ứng với các nồng độ ban đầu là 1×10^2 ng/ μL ở DNA của vi khuẩn *Salmonella* sp. và 6×10^1 ng/ μL với DNA của *Staphylococcus aureus* sử dụng cặp mồi đặc hiệu đã được khảo sát tối ưu [4, 7]. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% ở 100 V trong thời gian 30 phút, nồng độ DNA tối thiểu cho phép phản ứng PCR phát hiện chủng vi khuẩn được đánh giá ở nồng độ DNA thấp nhất vẫn xuất hiện vạch DNA dương tính (+) từ phản ứng PCR trên gel điện di agarose 1%.

2.3.3. Khảo sát nhiệt độ bắt cặp mồi T_m

Khảo sát này nhằm xác định sai số cho phép về thông số nhiệt độ của thiết bị với việc khảo sát được tiến hành trong khoảng nhiệt độ từ 53 °C đến 58 °C. Sản phẩm PCR được sử dụng qua phương pháp điện di kiểm tra trên gel agarose 1%, đệm TAE 0,5X, hiệu điện thế 100 V trong vòng 30 phút.

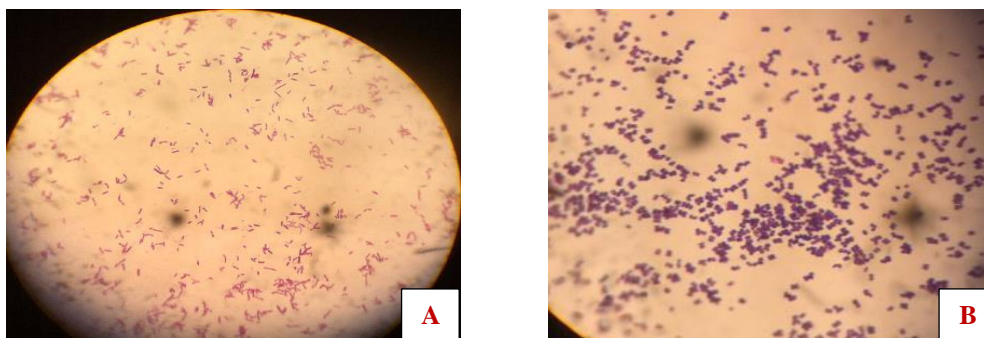
2.3.4. Phương pháp xác định ngưỡng phát hiện của phản ứng multiplex PCR đối với 2 loại vi khuẩn *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus*

DNA tổng số được tách chiết từ vi khuẩn *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* theo các nồng độ pha loãng từ 10^{-1} đến 10^{-8} được sử dụng làm khuôn cho phản ứng multiplex PCR. Ngưỡng phát hiện của phản ứng multiplex PCR được xác định là nồng độ DNA thấp nhất mà vẫn cho phép hình thành được vạch sản phẩm PCR trên hình ảnh điện di. Phản ứng multiplex PCR dương tính (+) khi xuất hiện cả hai vạch sản phẩm PCR 284 bp và 439 bp trên bản điện di gel agarose 1% [13, 14].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn

Mẫu phân lập được chọn lọc nhanh và làm thuần ở môi trường Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) chọn lọc các khuẩn lạc có tâm đen từ thực phẩm và Baird Parker Agar Base (BPA) theo phương pháp phân loại Bergey's và quy trình phân lập theo kiến nghị (www.sigmaaldrich.com) cho kết quả biểu hiện cơ bản các loài vi khuẩn phân lập thuộc chi *Salmonella* và *Staphylococcus* (Hình 1).



Job title: Nucleotide Sequence (241 letters)

RID: OEGFONM2014 (Expires on 12-06 10:11 am)

Query ID: ldlQuery_165893

Description: None

Molecule type: nucleic acid

Query Length: 241

Database Name: nr

Description: Nucleotide collection (nt)

Program: BLASTN 2.8.1+ ▶ Citation

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Mlivaiksee str. SA19950795 chromosome complete genome	448	565	100%	3e-122	99%	CP030175.1
<input type="checkbox"/>	Salmonella enterica strain SA20101045 chromosome complete genome	448	565	100%	3e-122	99%	CP030233.1
<input type="checkbox"/>	Salmonella enterica strain SA20051401 chromosome complete genome	448	565	100%	3e-122	99%	CP030196.1
<input type="checkbox"/>	Salmonella choleraesuis strain GHPS1 invasion protein (invA) gene, partial cds	437	437	100%	1e-118	99%	EU348367.1
<input type="checkbox"/>	Salmonella typhimurium strain CVCC541 invasion protein (invA) gene, partial cds	437	437	100%	1e-118	99%	EU348365.1
<input type="checkbox"/>	Salmonella bongori strain CNM-256 invA (invA) gene, partial cds	437	437	100%	1e-118	99%	DQ644633.1
<input type="checkbox"/>	Salmonella bongori strain CNM-262 invA (invA) gene, partial cds	437	437	100%	1e-118	99%	DQ644632.1
<input type="checkbox"/>	Salmonella enterica subsp. houtense strain ST-22 invA (invA) gene, partial cds	437	437	100%	1e-118	99%	DQ644627.1
<input type="checkbox"/>	Salmonella enterica subsp. salamae strain CNM-169 invA (invA) gene, partial cds	437	437	100%	1e-118	99%	DQ644619.1
<input type="checkbox"/>	Salmonella enterica subsp. enterica strain CNM-3685-93 invA (invA) gene, partial cds	437	437	100%	1e-118	99%	DQ644615.1
<input type="checkbox"/>	Salmonella gallinarum invasion protein (invA) gene, complete cds	437	437	100%	1e-118	99%	U43273.1
<input type="checkbox"/>	Salmonella enterica invasion protein (invA) gene, partial cds	437	437	100%	1e-118	99%	U43272.1

Hình 1. Kết quả định danh của vi khuẩn *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus*

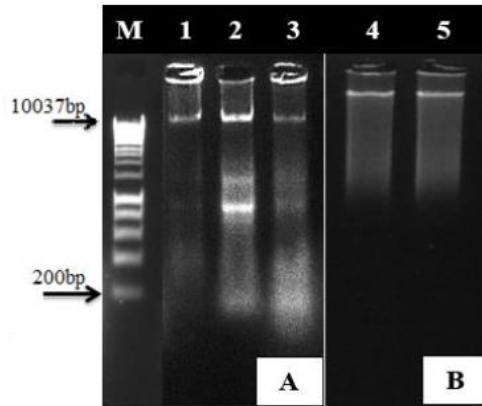
(A: Hình nhuộm Gram và quan sát kính hiển vi của vi khuẩn *Salmonella*;

B: Hình nhuộm Gram và quan sát kính hiển vi của vi khuẩn *Staphylococcus aureus*;

C: Kết quả định danh bằng sinh học phân tử đoạn gen khuếch đại bằng môi invA).

Kết quả điện di kiểm tra DNA tổng số bằng phản ứng shock nhiệt của 2 loài vi khuẩn nghiên cứu được thể hiện trong Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm tách chiết DNA tổng số cho thấy đã tách chiết thành công DNA của chủng *Salmonella* sp. (Hình 3A) và *Staphylococcus aureus* (Hình 2B), các vạch đều xuất hiện rõ ràng ở cả 5 giếng, vạch hiện rõ nét, các vạch nằm gần giếng điện di điều này cho thấy DNA tổng số không bị đứt gãy quá nhiều nên DNA đủ điều kiện về chất lượng để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo. Để xác định nồng độ DNA trong các mẫu phân tích, kết quả xác định tỷ số OD_{260}/OD_{280} và nồng độ DNA tổng số của 2 loài vi khuẩn nghiên cứu với các mẫu có giá trị OD_{260nm}/OD_{280nm} ở các mẫu 1, 2 và 3 lần lượt với giá trị tương ứng đánh giá tinh sạch tinh cặn (giá trị 1,8–2,0) là 1,959; 1,842 và 1,812. Kết quả này cũng tạo nền tảng cho nghiên cứu khảo sát quy trình phản ứng PCR 2 loài

vi khuẩn đạt kết quả cao và chính xác hơn. DNA của 2 loài vi khuẩn sẽ được tiếp tục được pha loãng theo các nồng độ 10^{-1} đến 10^{-9} tương ứng với các nồng độ ban đầu là 1×10^2 ng/ μ L ở DNA của vi khuẩn *Salmonella* sp. và 6×10^1 ng/ μ L với DNA của *Staphylococcus aureus* sử dụng cặp mồi đặc hiệu đã được khảo sát tối ưu cho thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm tách chiết DNA tổng số của các vi khuẩn (A): Vi khuẩn *Salmonella* sp. (B): Vi khuẩn *Staphylococcus aureus*.

Trong đó: M: thang chuẩn DNA 1 kb; Giếng số 1–3 (A): mẫu DNA tổng số của vi khuẩn *Salmonella* sp. Giếng số 4–5 (B): mẫu DNA tổng số của vi khuẩn *Staphylococcus aureus*.

3.2. Khảo sát xây dựng quy trình phản ứng multiplex PCR phát hiện nhanh và đồng thời *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus*

3.2.1. Khảo sát khả năng bắt cặp đặc hiệu của mồi

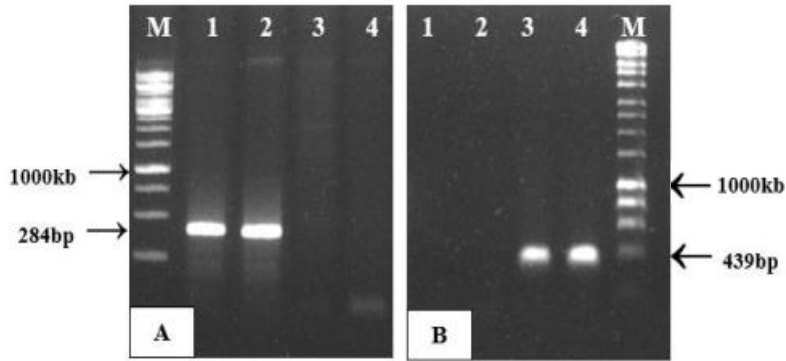
Sản phẩm PCR xuất hiện trên giếng số 1 & 2 (Hình 3A), giếng số 3 & 4 (Hình 3B) với một vạch DNA rõ nét có kích thước tương ứng gần với vạch 284 bp và 439 bp với kích thước sản phẩm PCR dự kiến (Hình 3 & Bảng 3). Đối với các mẫu còn lại qua giếng số 3–4 (A) và 1–2 (B), DNA tổng số được sử dụng không có gen mục tiêu, vì thế không xuất hiện sản phẩm PCR. Kết quả thử nghiệm cho thấy mồi *invAF/R* và *nucF/R* được sử dụng trong nghiên cứu này là đặc hiệu với 2 chủng vi khuẩn *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* (Bảng 3 & Hình 3). Kết quả được biểu hiện ở phương pháp điện di và biểu hiện trên gel agarose 1%, tuy nhiên, do thời gian chạy khác nhau nên kích thước đoạn gen có biểu hiện chưa tốt so với đối chứng trên bản điện di.

Bảng 3. Khảo sát khả năng bắt cặp đặc hiệu của mồi

Các loài vi khuẩn	Mồi đặc hiệu với phản ứng PCR đơn	
	<i>invAF/R</i>	<i>nucF/R</i>
<i>Salmonella</i> sp.	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+
<i>E. coli</i> đối chứng	-	-

+: phản ứng dương tính

-: phản ứng âm tính



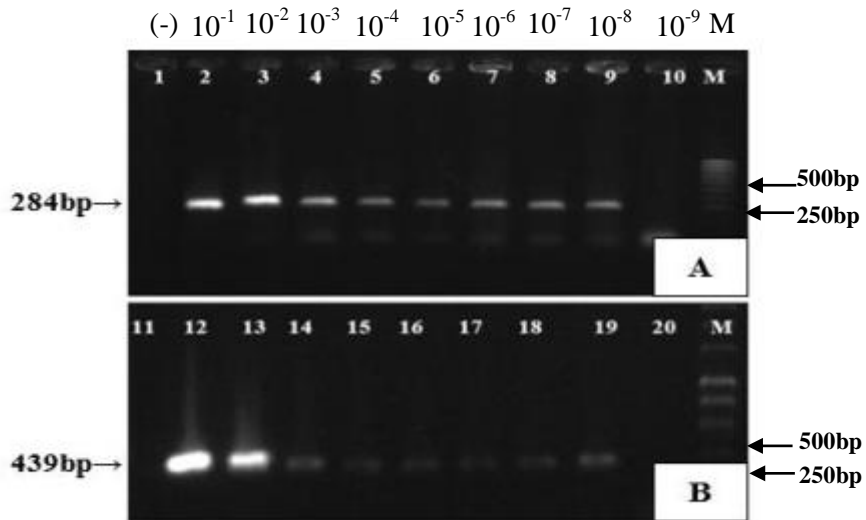
Hình 3. Kết quả điện di kiểm tra độ đặc hiệu của sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi *invA-F/R* (giếng 1-4 (A)) cặp mồi *nucF/R* (giếng 1-4 (B)).

Trong đó: Hình 3A giếng M: thang DNA, Giếng 1-2: mẫu DNA từ vi khuẩn *Salmonella sp.*; giếng 3: mẫu DNA từ vi khuẩn *Staphylococcus aureus*; giếng 4: mẫu DNA từ *E.coli*.

Hình 3B giếng M: thang DNA, Giếng 1: mẫu DNA *E.coli*; Giếng 2: mẫu DNA vi khuẩn *Salmonella sp.*; Giếng 3-4: mẫu DNA tách chiết từ vi khuẩn *Staphylococcus aureus*.

3.2.2. Khảo sát độ nồng độ DNA tối thiểu của các phản ứng PCR đơn, phát hiện riêng rẽ *Salmonella sp.* và *Staphylococcus aureus*

Kết quả nghiên cứu thể hiện khi giảm dần nồng độ DNA khuôn trong phản ứng PCR cường độ vạch DNA trên hình ảnh điện di cũng giảm dần (Hình 4). Nồng độ DNA khuôn của *Salmonella sp.* khi giảm đến 1×10^{-5} ng/ μ L thì đoạn gene được khuếch đại qua PCR không xuất hiện ở giếng số 10 (Hình 4A). Điều này chứng minh rằng với nồng độ DNA khuôn tách chiết từ vi khuẩn *Salmonella sp.* ở nồng độ pha loãng 1×10^{-5} ng/ μ L với mức độ quá thấp và không đủ để phản ứng tạo sản phẩm PCR để nhận thấy được trên bản điện di với gel agarose. Vì vậy, nồng độ pha loãng tối thiểu của *Salmonella sp.* trong phản ứng 25 μ L đối với cặp mồi *invAF/R* cho phép ở 1×10^{-4} ng/ μ L (Hình 4).



Hình 4. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR sử dụng nồng độ DNA khuôn ở các nồng độ khác nhau (A: nồng độ DNA khảo sát ở vi khuẩn theo nồng độ của *Salmonella sp.* với nồng độ pha loãng từ DNA gốc là 1×10^2 ng/ μ L; B: nồng độ DNA khảo sát ở vi khuẩn theo nồng độ của *Staphylococcus aureus* với nồng độ từ DNA gốc là 6×10^1 ng/ μ L)

Đối với phản ứng PCR với mạch DNA khuôn của *Staphylococcus aureus* giảm đến 6×10^{-6} ng/ μ L thì phản ứng không xuất hiện đặc hiệu ở giếng số 20. Ở nồng độ 6×10^{-9} ng/ μ L

DNA khuôn của *Staphylococcus aureus* quá thấp và không xuất hiện vạch của sản phẩm PCR trên bản điện di gel agarose. Do đó, nồng độ pha loãng tối thiểu của *Staphylococcus aureus* trong phản ứng 25 μL đối với cặp mồi *nucF/R* là 6×10^{-8} ng/mL (Hình 5B). Ngưỡng phát hiện DNA khuôn tối thiểu của *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* để tối ưu phản ứng multiplex PCR sử dụng đồng thời 2 cặp mồi *invAF/R* và *nucF/R* được kết luận và lựa chọn ở mức 1×10^{-4} ng/ μL và 6×10^{-8} ng/ μL trong mỗi phản ứng 25 μL . Theo các nghiên cứu đã công bố về nồng độ DNA khuôn tối thiểu cho phản ứng PCR như nghiên cứu của Kumar *et al.* (2006) trong việc phát hiện *Salmonella typhi* thì nồng độ DNA khuôn tối thiểu là 3×10^{-3} ng/ μL . Như vậy, nồng độ DNA khuôn tối thiểu của phản ứng PCR trong nghiên cứu này cũng tốt hơn rất nhiều so với ngưỡng phát hiện tối hạn so với các nghiên cứu khác đã công bố [3].

Để thực hiện tối ưu các điều kiện cho phản ứng multiplex PCR tiếp theo việc xác định nồng độ DNA khuôn tối thiểu của *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* là rất quan trọng. Nếu nồng độ DNA khuôn của *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* được sử dụng khi tối ưu các điều kiện cho phản ứng PCR không có sự khác biệt rõ ràng giữa kết quả của các vạch điện di sẽ gây khó khăn khi nhận biết được sự khác nhau. Các điều kiện cho phản ứng multiplex PCR phát hiện *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* với nồng độ DNA khuôn của *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* được lựa chọn tương ứng là 1×10^{-4} ng/ μL và 6×10^{-8} ng/ μL .

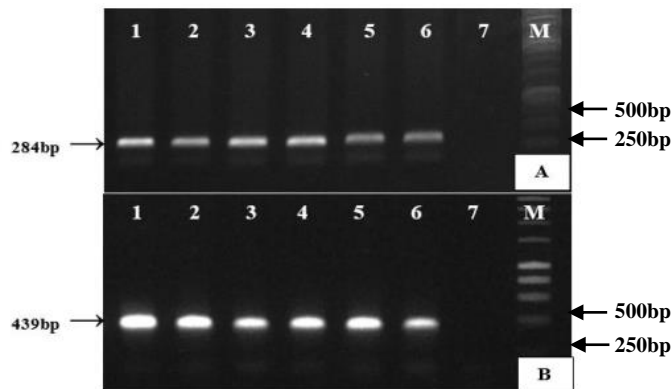
3.2.3. Khảo sát nhiệt độ bắt cặp của mồi và DNA khuôn

Kết quả khảo sát cho thấy trong phạm vi nhiệt độ bắt cặp khoảng 53-58 $^{\circ}\text{C}$. Ở 53 $^{\circ}\text{C}$ sản phẩm PCR ở 2 gen *invA* và *nuclease* đều cho kết quả vạch DNA sáng rõ ràng. Tuy nhiên, ở nhiệt độ 58 $^{\circ}\text{C}$, cả 2 gen đều cho vạch sản phẩm mờ, cho thấy kết quả phản ứng PCR thay đổi theo chiều giảm dần tín hiệu khuếch đại. Đồng thời các vạch sản phẩm có kích thước 284 bp ở gen *invA* khá mờ; tuy nhiên, DNA của gen có kết quả phản ứng với cặp mồi đặc hiệu ở các nhiệt độ khảo sát. Do đó, nhiệt độ lai tối ưu được lựa chọn ở 53 $^{\circ}\text{C}$, nồng độ DNA khuôn của *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* lần lượt là 1×10^2 ng/ μL và 6×10^1 ng/ μL , nồng độ mồi được sử dụng 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ trong phản ứng multiplex PCR thử nghiệm (Hình 5, Bảng 4).

Bảng 4. Kết quả khảo sát nhiệt độ bắt cặp của mồi và DNA lên phản ứng PCR

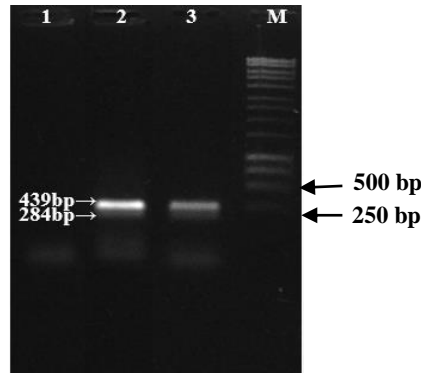
Nhiệt độ T_m	53 $^{\circ}\text{C}$	54 $^{\circ}\text{C}$	55 $^{\circ}\text{C}$	56 $^{\circ}\text{C}$	57 $^{\circ}\text{C}$	58 $^{\circ}\text{C}$
Sản phẩm PCR của gen <i>invA</i>	+	+	+	+	+	+
Sản phẩm PCR của gen <i>nuc</i>	+	+	+	+	+	+

+: phản ứng dương tính; -: phản ứng âm tính



Hình 5. Kết quả điện di đánh giá kết quả khảo sát nhiệt độ bắt cặp của mồi và DNA lên phản ứng PCR (Hình A) M: thang DNA, giếng 1-6 nhiệt độ từ 53-58 $^{\circ}\text{C}$ với cặp mồi *invAF-R*, giếng số 7: chứng âm; (Hình B) giếng 1-6 nhiệt độ từ 53-58 $^{\circ}\text{C}$ với cặp mồi *nucF-R*; giếng số 7: chứng âm.

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm của phản ứng multiplex PCR biểu hiện 2 phản ứng dương tính đều xuất hiện 2 vạch DNA rõ ràng ở nồng độ agarose 1% (Hình 6). Trong đó, vạch thứ nhất có kích thước 439 bp tương ứng với kích thước của sản phẩm PCR khuếch đại vùng gen nuclease (*nuc*) của *Staphylococcus aureus* bởi cặp mồi *nucF-R* và vạch thứ 2 có kích thước 284 bp tương ứng với kích thước của sản phẩm PCR khuếch đại vùng gen xâm nhiễm (invasive) của vi khuẩn *Salmonella* sp. bởi cặp mồi *invAF-R*. Kết quả này cho phép khẳng định phản ứng multiplex PCR với nhiệt độ gắn mồi là 53 °C hoàn toàn có thể khuếch đại đặc hiệu vùng gen mục tiêu tương ứng. Tuy nhiên, việc so sánh cường độ giữa 2 vạch sản phẩm DNA thu được của phản ứng multiplex PCR trong hình ảnh điện di, cường độ hai vạch sản phẩm được khuếch đại bởi cặp mồi *nucF/R* (439 bp) có kích thước lớn hơn so với cường độ vạch sản phẩm khuếch đại bởi cặp mồi *invAF/R* (284 bp) dù nồng độ DNA khuôn của hai vi khuẩn sử dụng là tương đương nhau. Điều này cho thấy ở nhiệt độ 53 °C phản ứng multiplex PCR với cặp mồi *nucF/R* có hiệu quả khuếch đại cao hơn so với cặp mồi *invAF/R*.



Hình 6. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm multiplex PCR với cặp mồi *invAF/R* và *nucF/R* nồng độ 0,6 µg/µL sử dụng khuôn DNA tổng số của *Salmonella* sp. và 60 ng/µL DNA tổng số của *Staphylococcus aureus*. (Giếng M: thang chuẩn DNA 1kb; giếng 1: mẫu kiểm chứng âm tính; giếng số 2 và 3: mẫu kiểm chứng dương tính).

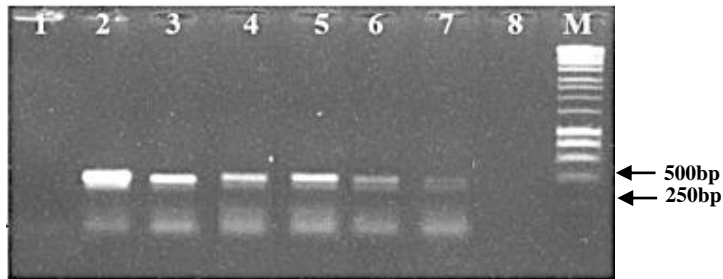
3.2.4. Thử nghiệm xác định độ nhạy của phản ứng multiplex PCR phát hiện nhanh và đồng thời *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus*

Ngưỡng phát hiện của phản ứng multiplex PCR được xác định là nồng độ DNA thấp nhất ở 300 CFU/mL đối với *Salmonella* sp. và 70 CFU/mL đối với *Staphylococcus aureus* mà vẫn cho phép nhận diện sản phẩm khuếch đại DNA từ phản ứng PCR qua điện di agarose 1% (Bảng 5, Hình 7). Khi nồng độ khuôn của *Salmonella* sp. giảm đến 30 CFU/mL và nồng độ *Staphylococcus aureus* giảm xuống 7 CFU/mL thì sản phẩm PCR không còn xuất hiện trên ảnh điện di ở giếng số 8. Giới hạn phát hiện là 30 CFU/mL đối với *Salmonella* sp. và 7 CFU/mL đối với *Staphylococcus aureus*. Có thể kết luận việc nhận diện tối thiểu của phương pháp này đối với *Salmonella* sp. nên dùng ở 300 CFU/mL trở lên, 70 CFU/mL đối với *Staphylococcus aureus*.

Bảng 5. Mật độ tế bào *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* được nuôi cấy có thể phát hiện được bằng phản ứng multiplex PCR

Mật độ tế bào <i>Salmonella</i> sp. (CFU/mL)	3×10^7	3×10^6	3×10^5	3×10^4	3×10^3	3×10^2	3×10^1
Mật độ tế bào <i>Staphylococcus aureus</i> (CFU/mL)	7×10^6	7×10^5	7×10^4	7×10^3	7×10^2	7×10^1	7
Sản phẩm PCR gen <i>invA</i>	+	+	+	+	+	+	-
Sản phẩm PCR gen <i>nuc</i>	+	+	+	+	+	+	-

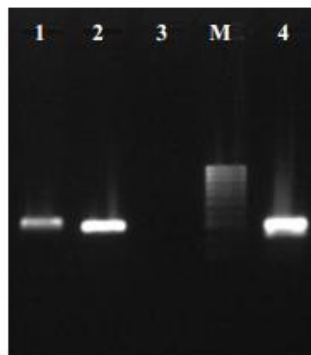
+: phản ứng dương tính; -: phản ứng âm tính.



Hình 7. Kết quả điện di kiểm tra mật độ tế bào *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* được nuôi cấy có thể phát hiện được bằng phản ứng multiplex PCR.
(M: thang chuẩn HypperLadder DNA 1 kb, giếng số 1: kiểm tra âm tính, giếng 2-8 tương ứng với nồng độ vi khuẩn *Salmonella* sp.)

3.2.5. Đề xuất quy trình multiplex PCR 2 cặp mồi để phát hiện nhanh và đồng thời vi khuẩn *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* trong thực phẩm bằng gen *invasive* và gen *nuclease*

Với các thông số được thiết lập và các khảo sát trên, quy trình multiplex PCR phát hiện đồng thời *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* trong thực phẩm được đề xuất như sau: với quy trình thực hiện phản ứng multiplex PCR 25 μ L/30 chu kỳ nhiệt phản ứng với 1,5 μ L 10X PCR buffer, 1,5 μ L $MgCl_2$ 25 mM, dNTPs 2,5 mM, 1 μ L nồng độ mồi *invA*-F/R 10 μ M, 2 μ L nồng độ mồi *nuc*-F/R 10 μ M, 0,2 μ L *Taq* Polymerase 5 U/mL, DNA khuôn 10 μ L (Hình 8). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR bao gồm giai đoạn biến tính ban đầu (ở 95 °C trong vòng 7 phút), giai đoạn khuếch đại 30 chu kỳ (biến tính 94 °C trong 30 giây, gắn mồi ở nhiệt độ 55 °C trong 30 giây, kéo dài mạch bổ sung ở 72 °C trong 30 giây), giai đoạn kéo dài cuối cùng (72 °C trong vòng 5 phút) và giai đoạn ủ, bảo quản (4 °C cho đến khi sử dụng sản phẩm). Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 1% trong dung dịch đệm TAE 0,5X ở hiệu điện thế 100V trong vòng 30 phút trên máy đọc Geldoc ở bước sóng 312 nm. Kết quả điện di có thể khẳng định mẫu nhiễm *Salmonella* sp. khi kết quả điện di xuất hiện 1 vạch sản phẩm có kích thước 284 bp (giếng 2), mẫu nhiễm *Staphylococcus aureus* khi xuất hiện 1 vạch sản phẩm có kích thước 439 bp (giếng 1). Mẫu nhiễm cả vi khuẩn *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* khi xuất hiện đồng thời 2 vạch sản phẩm 439 bp và 284 bp (giếng 4) và mẫu âm tính được đánh giá khi không xuất hiện vạch trên gel agarose điện di (giếng 3) (Hình 8).



Hình 8. Kết quả của phản ứng multiplex PCR phát hiện đồng thời *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus*.
(M: thang chuẩn DNA 100 bp; giếng số 1: kết quả dương tính *Staphylococcus aureus*; giếng số 2: kết quả dương tính *Salmonella* sp.; giếng số 3: kết quả âm tính *Salmonella* sp.; giếng số 4: kết quả dương tính với *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus*).

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Trong nghiên cứu này, việc xây dựng thành công quy trình phát hiện nhanh vi khuẩn *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* bằng kỹ thuật multiplex PCR đánh dấu bước đầu cho các kết quả và tiềm năng của nghiên cứu về sản xuất bộ kit thương mại định danh nhanh vi khuẩn gây bệnh trên các mẫu thực phẩm. Các thành phần phản ứng multiplex PCR với tổng thể tích là 25 μL gồm 2,5 μL PCR buffer 10X, 1,5 μL MgCl_2 25 mM, 3 μL dNTPs 2,5 mM; 1 μL mỗi mỗi *invA*-F & *invA*-R ở nồng độ 10 mM; 2 μL mỗi mỗi *nucF* ở nồng độ 10 mM; 10 μL DNA khuôn và 1,8 μL H_2O được tối ưu cho phản ứng đặc hiệu nhất. Điều kiện chu trình nhiệt của phản ứng multiplex PCR gồm 30 chu kỳ với giai đoạn biến tính ban đầu 95 °C trong vòng 7 phút; nhiệt độ biến tính ở 94 °C 30 giây, gắn mỗi 53 °C trong 45 giây, kéo dài mỗi ở 72 °C trong 45 giây; pha kéo dài cuối cùng ở 72 °C trong 5 phút. Sản phẩm thu nhận được có thể khuếch đại 2 gen *invasive* và *nuclease* của 2 loài vi khuẩn. Tuy nhiên, sản phẩm vẫn chưa đồng nhất và độ dài của trình tự khá gần nhau gây khó khăn trong nhận diện các gen của vi khuẩn. Độ nhạy của phản ứng multiplex PCR ở 3×10^2 CFU/mL đối với *Salmonella* sp. và 70 CFU/mL đối với *Staphylococcus aureus*. Các điều kiện cho phản ứng multiplex PCR phát hiện *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* với nồng độ DNA khuôn của *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* được lựa chọn tương ứng là 1×10^{-4} ng/ μL và 6×10^{-8} ng/ μL . Việc nghiên cứu thời gian tăng sinh cần thiết của các mẫu thực phẩm nhiễm *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* 1 CFU/ 25g mẫu sau 14 giờ tăng sinh có thể phát hiện bằng phương pháp multiplex PCR với hai cặp mỗi *invAF-invAR* và *nucF-nucR*. Việc tiếp tục thử nghiệm quy trình multiplex PCR phát hiện nhanh và đồng thời *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* trên nhiều mẫu thực phẩm để xây dựng quy trình kiểm định bằng KIT thử nghiệm phát hiện nhanh và đồng thời *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* cần được triển khai mức độ đánh giá độ đặc hiệu ở ngưỡng nghiên cứu tế bào và hàm lượng DNA tới hạn của các loài vi khuẩn gây bệnh. Bên cạnh đó, việc đánh giá các đặc hiệu của nghiên cứu này cho các nhóm vi khuẩn khác trong nhóm vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm cũng cần được phát triển ở những nghiên cứu rộng rãi và đa dạng về các loại thực phẩm dễ tạp nhiễm khi triển khai thực hiện phản ứng multiplex PCR. Việc chọn lựa các cặp mỗi có những phản ứng đặc hiệu hơn và có kích thước nhận diện dễ dàng hơn cần được đánh giá trong các nghiên cứu về sau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cục vệ sinh an toàn thực phẩm, Bộ Y tế - Báo cáo tình hình Vệ sinh an toàn thực phẩm, 2018.
2. Nguyễn Tuấn Anh – Bước đầu nghiên cứu xây dựng phương pháp phát hiện nhanh bệnh tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*) bằng kỹ thuật PCR, Đại học Nông Lâm (2015).
3. Kumar S., Balakrishna K. & Batra H. - Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) by selective amplification of *invA*, *viaB*, *fliC*- d and *prt* genes by polymerase chain reaction in mutiplex format, Letters in Applied Microbiology **42** (2) (2006) 149-154.
4. De Freitas C. G., Santana A. P., Silva P. H., Golcalves V. S., BarrosMde A., Torres F. A., Murata L. S., Perecmanis S. - PCR multiplex for detection of *Salmonella enteritidis* and typhymirium and occurrence in poultry meat, International Journal of Food Microbiology **139** (1) (2010) 15-22.
5. Trần Thị Xuân Mai, Võ Thị Thanh Phương, Trần Thị Hoàng Yến & Nguyễn Văn Bé - Phát hiện nhanh *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* hiện diện trong thực phẩm bằng

- kỹ thuật PCR đa môi (multiplex PCR), Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ **20b** (2011) 198-208.
6. Lee, S. H., Jung, B.Y., Rayamahji, N. Lee, H.S., Jeon W.J, Kweon, K.H & Yoo, H.S. - A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *enteritidis* in meats, Journal of Vet Sciences **10** (1) (2009) 43-51.
 7. Meng, J., Zhao, S., Doyle, M. P., Mitchell, S. E. & Kresovich, S. - Polymerase chain reaction for detecting *Escherichia coli* O157: H7, International Journal of Food Microbiology **32** (1-2) (1996) 103-113.
 8. Garrido A., Chapela M. J., Roman B., Fajardo P., Lago J., Vieites J. M. & Cabado, A.G. - A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples, Food Control **30**(1) (2013) 76-85.
 9. Rahn, K., De Grandis, S. A., Clarke, R. C., McEwen, S. A., Galan, J. E., Ginocchio, C., Curtiss III R. & 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 **6** (4) (1992) 271-279.
 10. Chiang, Y.-C., Yang, C.-Y., Li, C., Ho, Y.-C., Lin, C.-K. & Tsen, H.-Y. - Identification of *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. and *Vibrio* spp. with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization, International Journal of Food Microbiology **107** (2) (2006) 131-137.
 11. Sasaki, T., S. Tsubakishita, Y. Tanaka, A. Sakusabe, M. Ohtsuka, S. Hirotaki, T. Kawakami, T. Fukata and K. Hiramatsu - Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive *Staphylococci*, Journal of clinical microbiology **48** (3) (2010) 765-769.
 12. Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Lee, H. Y., Noorlis, A., Zainazor, T. C. T., Tang, J. Y. H., Ghazali, F. M., Cheah, Y. K. & Nakaguchi, Y. - Multiplex PCR for the concurrent detection and differentiation of *Salmonella* spp., *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium*, Tropical Medicine and Health **39** (1) (2011) 9-15.
 13. Le Loir Y., Baron F. & Gautier M. - *Staphylococcus aureus* and food poisoning, Genetics Molecular Research **2** (1) (2003) 63-76.
 14. Normanno G., Firinu A., Virgilio S., Mula G., Di Giannatale D., Salinetti A. P., Salandra G. L., Bartoli M., Zuccon F., Pirino T., Sias S., Parisi A., Quaglia N. C. & Celano G. V. - Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy, International Journal of Food Microbiology **98**(1) (2005) 73-79.

ABSTRACT

STUDY OF MOLECULAR IDENTIFICATION USING MULTIPLEX PCR IN *Salmonella* sp. & *Staphylococcus aureus* DIAGNOSTICS CAUSING FOOD POISONING DISEASES

Nguyen Thanh Luan*, Luong Thi Hieu, Cao Nguyen Khanh Linh
Ho Chi Minh City University of Food Industry
*Email: luannt@cntp.edu.vn

The identification of infectious and opportunistic microorganism has recently been based on traditional culturing with low and cost effective, time controlling and hard manipulation for users and agencies. The new era of gene techniques that applied on observing, patrolling bacterial contamination to take minor times for prevention and medical cures have been considered as essential needs. The discovery of multiplex PCR could be applied in medical diagnostic because of quick returns, high sensitivity and parallel amplification of DNA bacteria for PCR results. This study indicates that the successful process of quick PCR amplification using multiplex PCR have been introduced for *Salmonella* sp. and *Staphylococcus aureus*. The optimal reaction of PCR have been chosen at the total volume of 25 μ L with 2.5 μ L 10X PCR buffer, 1.5 μ L $MgCl_2$ 25 mM, 3 μ L dNTPs 2.5 mM; 1 μ L of *invA*/R, 2.0 μ L each primer of *nucF*/R respectively, 10 μ L DNA templates và 1.8 μ L dilution H_2O . The highest sensitivity of multiplex PCR also showed and complied at 300 CFU/mL for *Salmonella* sp. and 70 CFU/mL for *Staphylococcus aureus* test. The essential time for poisonous sample culturing (1 CFU/25g sample) required at least 14 hours of growing culture in medium. The specific evaluation of this study for the other bacteria has been considered in larger scale from different types of foods and sources when applying multiplex PCR.

Keywords: Multiplex PCR, food poisoning, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *invA*, *nuclease*.