

Nghiên cứu thực trạng nhiễm trực khuẩn *Listeria monocytogenes* trong một số thức ăn chế biến bảo quản lạnh và thử nghiệm que phát hiện *Listeria monocytogenes*

Phạm Đức Minh*; Phạm Ngọc Châu*; Hoàng Văn Lương*

TÓM TẮT

Dùng kỹ thuật nuôi cấy, PCR và que thử nhanh để phát hiện *L. monocytogenes* trong 160 mẫu xúc xích, pa-tê, sữa tươi, phomat tại Hà Nội. Kết quả: phương pháp nuôi cấy 12/160 (7,5%) mẫu dương tính *L. monocytogenes*, trong đó xúc xích (12,5%), pa-tê (7,5%), sữa (2,5%), pho-mát (7,5%). Kết quả phân tích PCR cho thấy 17/160 (10,625%) mẫu dương tính *L. monocytogenes*, que thử nhanh phát hiện được 11/160 (6,875%) mẫu nhiễm *L. monocytogenes*. Que thử nhanh và PCR có mức độ phù hợp chẩn đoán Kappa với phương pháp nuôi cấy lần lượt là 0,95 và 0,81. Phương pháp dùng que thử nhanh có ưu điểm dễ áp dụng, đơn giản, độ tin cậy cao, có thể sử dụng thay thế phương pháp nuôi cấy phát hiện sự có mặt của vi khuẩn *L. monocytogenes*.

* Từ khóa: *L. monocytogenes*; Thức ăn bảo quản lạnh; Que thử nhanh; Nuôi cấy; PCR.

Situation of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to-use and dipstick application trial

SUMMARY

In this study, 160 processed cold storage food samples in Hanoi were collected and analyzed by culture, PCR and dipstick techniques. The culture showed that 12/160 (7.5%) were positive with *L. monocytogenes*, including hotdog (12.5%), paté (7.5%), fresh milk (2.5%), cheese (7.5%). Meanwhile, PCR showed that 17/160 (10,625%) samples were positive and dipstick 11/160 (6,875%) sample were positive. Dipstick and PCR had high agreement coefficient with culture, Kappa index was 0.95 and 0.81 respectively. Dipstick is simple and has high accuracy, therefore it would be a potential alternation for conventional methods in determination of *L. monocytogenes* pollution.

* Key words: *Listeria monocytogenes*, Cold storage food; Culture; Dipstick techniques; PCR.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngộ độc thực phẩm do thức ăn bị nhiễm khuẩn *Listeria monocytogenes*, đặc biệt là thức ăn chế biến dùng ngay, có thể gây

bệnh Listeriosis (Gallagher và CS, 2003) để lại hậu quả nghiêm trọng như nhiễm khuẩn huyết, viêm màng não, sảy thai, thai chết lưu và đẻ non [5]. Ở các nước phát triển, *L. monocytogenes* là một chỉ tiêu được kiểm

* Học viện quân y

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Thái Sơn soát trong an toàn thực phẩm, tuy nhiên tại Việt Nam, nhiễm *L. monocytogenes* chưa được quan tâm [1]. Trực khuẩn *L. monocytogenes* có khả năng nhân lên ngay cả trong tủ lạnh.

Thực phẩm dễ nhiễm *L. monocytogenes* là thức ăn bảo quản lạnh như xúc xích, sữa, pho-mát, pa-tê. Có thể phát hiện

L. monocytogenes trong thực phẩm bằng nuôi cấy, PCR hoặc test kit. Mục tiêu nghiên cứu:

- Xác định mức độ nhiễm *L. monocytogenes* trong một số loại thức ăn chế biến bảo quản lạnh dùng ăn ngay không cần hâm nóng.

- Thử nghiệm que thử nhanh phát hiện trực khuẩn *L. monocytogenes* trong thực phẩm.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

160 mẫu thực phẩm: sữa tươi, phô mát, xúc xích, pa-tê từ cửa hàng thực phẩm, nhà máy chế biến thực phẩm, hộ gia đình tại khu vực Thành phố Hà Nội, từ 6 - 2010 đến 12 - 2010.

2. Dụng cụ, môi trường và thuốc thử.

Máy điều nhiệt GeneAmp PCR system 9700 AB (Mỹ), ly tâm lạnh Mikro 22R (Hettech, Đức), máy soi và chụp gel Dolphin Doc (Wealtec, Mỹ).

Môi trường pepton 0,1%; thạch tryptone soya có 0,6% cao men (TSA-YE); thạch máu cừu; Clurk-Lubs; canh thang đường manitol, xylose, rhamnose 5%; bộ nhuộm Gram.

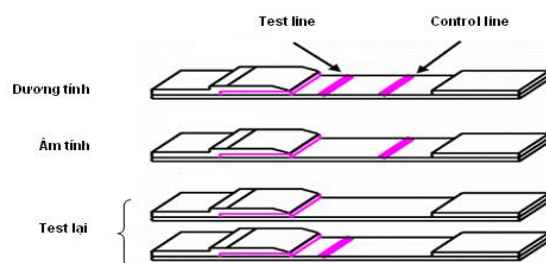
Sinh phẩm Nonstop nested PCR (Công ty Nam Khoa): ^{NK}NSNT List-PCR Mix, ^{NK}ListDNA-IC, chứng (+), đệm hoàn nguyên, chứng (-), *Instagene matrix*. Que thử nhanh có khả năng phát hiện trực khuẩn *Listeria monocytogenes* ở ngưỡng nồng độ 10^6 cfu/ml.

3. Phương pháp nghiên cứu.

Nuôi cấy phân lập và định danh *L. monocytogenes* theo tiêu chuẩn Ngành Y tế của Hội Khoa học Kỹ thuật An toàn Thực phẩm nhóm TQTP 52 TCN-TQTP 0002: (2003) có hiệu lực từ ngày 25-3-2003, Bộ Y tế.

Phương pháp nhân gen Nested PCR. Kit Nonstop nested PCR phát hiện *Listeria monocytogenes*. Tách ADN của *L. monocytogenes*: bằng sinh phẩm Instagene matrix của Biorad. Phản ứng nested PCR: vòng 1 có 10 chu kỳ, gồm biến tính 94°C trong 30 giây, bắt cặp tại 60°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 2 phút. Vòng 2 có 40 chu kỳ gồm biến tính 94°C trong 30 giây, bắt cặp tại 52°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 1 phút.

Que thử nhanh TK phát hiện mầm bệnh *Listeria monocytogenes* trong thực phẩm.



Hình 1: Đánh giá kết quả que thử nhanh.

Phân tích số liệu SPSS 13.0, Epicalc 2000. So sách mức độ phù hợp chẩn đoán bằng hệ số Kappa, theo tiêu chuẩn Landis & Koch's (1977) [7].

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Nuôi cấy phân lập trực khuẩn *Listeria monocytogenes*.

Kết quả phân lập *Listeria* trên thạch Oxford cho thấy: 16/160 mẫu có khuẩn lạc đặc trưng với *L. monocytogenes*. Tiến hành nhuộm, quan sát hình thể và thử phản ứng sinh hóa để xác định chính xác chủng vi khuẩn thu được kết quả như sau:

Bảng 1: Kết quả kiểm tra sự bắt màu, hình thể và tính chất sinh hóa.

TÊN MẪU	GRAM	HÌNH THỂ	Di động	Catalaza	MR	VP	Xylose	Rhamnose	Manitol	KẾT LUẬN
XX3	+	Trực khuẩn	+	+	+	+	-	+	-	+
XX8	+	Trực khuẩn	+	+	+	+	-	+	-	+
XX10	+	Trực khuẩn	+	+	+	+	-	+	-	+
XX14	+	Trực khuẩn	+	-	+	-	-	-	-	-
XX18	+	Trực khuẩn	+	+	+	+	-	+	-	+
XX19	+	Trực khuẩn	+	+	+	+	-	+	-	+
XX24	+	Trực khuẩn	+	-	+	-	-	-	-	-
PT2	+	Trực khuẩn	+	+	+	+	-	+	-	+
PT6	+	Trực khuẩn	+	+	+	+	-	+	-	+
PT12	+	Trực khuẩn	+	+	+	+	-	+	-	+
S6	+	Trực khuẩn	+	+	+	+	-	+	-	+
S28	+	Trực khuẩn	+	-	+	-	-	-	-	-
PM5	+	Trực khuẩn	+	+	+	+	-	+	-	+
PM9	+	Trực khuẩn	+	-	+	-	-	-	-	-
PM15	+	Trực khuẩn	+	+	+	+	-	+	-	+
PM30	+	Trực khuẩn	+	+	+	+	-	+	-	+
Chứng	+	Trực khuẩn	+	+	+	+	-	+	-	+

(Ghi chú: PM = Pho-mát; PT = Pa-tê; S = Sữa; XX = Xúc xích.)

Bảng 2: Kết quả phân tích bằng kỹ thuật nuôi cấy, phân lập.

THỰC PHẨM	SỐ MẪU KIỂM TRA	SỐ MẪU (+) <i>L. monocytogenes</i>	%
Xúc xích	40	5	12,5
Pa-tê	40	3	7,5
Sữa tươi	40	1	2,5
Phomat	40	3	7,5
Tổng	160	12	7,5

12/160 mẫu dương tính với *L. monocytogenes*.

2. Kết quả phát hiện bằng PCR.

Bảng 3: Kết quả phân tích bằng kỹ thuật PCR.

THỰC PHẨM	SỐ MẪU KIỂM TRA	SỐ MẪU (+) <i>L. monocytogenes</i>	%
Xúc xích	40	7	17,5
Pa-tê	40	4	10
Sữa tươi	40	2	5
Pho-mát	40	4	10
Tổng	160	17	10,625

17/160 mẫu (PCR) dương tính, như vậy phương pháp PCR cho kết quả dương tính cao hơn.

3. Kết quả phát hiện *Listeria monocytogenes* bằng que thử nhanh.

Bảng 4: Kết quả phân tích bằng kỹ thuật que thử nhanh.

THỰC PHẨM	SỐ MẪU KIỂM TRA	SỐ MẪU (+) <i>L. monocytogenes</i>	%
Xúc xích	40	4	10
Pa-tê	40	3	7,5
Sữa tươi	40	1	2,5
Phomat	40	3	7,5
Tổng	160	11	6,875

Số mẫu thực phẩm dương tính khi thử que thử nhanh chỉ ít hơn nuôi cấy phân lập 1 mẫu.

4. So sánh giá trị chẩn đoán của các phương pháp.

So sánh kết quả của phương pháp nuôi cấy và PCR về độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị chẩn đoán dương tính, giá trị chẩn đoán âm tính và hệ số phù chẩn đoán Kappa.

Bảng 5: Kết quả thử nghiệm PCR trên thực phẩm so với nuôi cấy.

	Kết quả	NUÔI CẤY		TỔNG
		(+)	(-)	
PCR	(+)	12	5	17

	(-)	0	143	143
Tổng		12	148	160
$\chi^2 = 0,95$; $p = 0,33$				
Kappa = 0,81				
Se = 100%; Sp = 97%; PPV = 71%; NPV = 100%				

(Se: Sensitivity; Sp: Specificity; PPV: Positive predict value; NPV: Negative predict value).

Kết quả phát hiện *L. monocytogenes* của phương pháp PCR và nuôi cấy không khác nhau với $\chi^2 = 0,95$ và $p > 0,05$; hệ số Kappa của hai phương pháp này là 0,81.

* So sánh kết quả của phương pháp nuôi cấy và que nhúng.

Bảng 6: Kết quả thử nghiệm que thử nhanh trên thực phẩm so với nuôi cấy.

		NUÔI CẤY		TỔNG	
		Kết quả	(+)		(-)
Que thử nhanh	(+)		11	0	11
	(-)		1	148	149
Tổng			12	148	160
$\chi^2 = 0,05$; $p = 0,83$					
Kappa = 0,95					
Se = 92%; Sp = 100%; PPV = 100%; NPV = 99%					

Kết quả: phát hiện *L. Monocytogenes* bằng phương pháp que thử nhanh và nuôi cấy không khác biệt có ý nghĩa thống kê với $\chi^2 = 0,05$ và $p > 0,05$, với hệ số Kappa của hai phương pháp này là 0,95, có thể dùng thay thế lẫn nhau.

BÀN LUẬN

1. Nhiễm *L. monocytogenes* trong thực phẩm và tình hình ngộ độc thực phẩm.

Tại Việt Nam, chưa có nhiều báo cáo về ngộ độc thực phẩm do *L. monocytogenes*. Tuy nhiên, năm 1996, Viện Pasteur TP. HCM đã phân lập được 2 chủng *L. monocytogenes* trong số 215 mẫu sữa chua, hải sản đông lạnh, thịt tươi sống, rau xanh [9]. Năm 1999, Viện Vệ sinh Y tế Công cộng cũng phân lập được 2 chủng *L. monocytogenes* từ 20 mẫu thực phẩm. Năm 2006, Phòng Kiểm nghiệm Thực phẩm, Viện Pasteur TP.HCM, phát hiện hải sản đông lạnh nhiễm *L. monocytogenes* 23/138 mẫu (23,9%) [9]. Tại Hà Nội, Nguyễn Minh Thực và CS (2008) phát hiện nhiễm *L. monocytogenes* trong tổng số 155 mẫu thực phẩm, bao gồm 49 sản phẩm thịt (xúc xích, nem chua) 11/49 (22,45%) mẫu thịt nhiễm *L. monocytogenes* [2]. Như vậy, tỷ lệ xuất hiện của chủng vi khuẩn này cũng có khuynh hướng gia tăng. Angela Ingianni và CS (2007) nghiên cứu trên 278 mẫu thịt tươi phát hiện 42 mẫu (15,4%) nhiễm *L. monocytogenes* [4]. Nghiên cứu của chúng tôi, kết quả phát hiện có 12/160

mẫu thức ăn (7,5%) nhiễm vi khuẩn *L.monocytogenes*. Trong đó, 5/40 mẫu xúc xích (12,5%), 3/40 mẫu pa-tê (7,5%), 1/40 mẫu sữa (2,5%) và 3/40 mẫu pho-mát (7,5%) nhiễm *L.monocytogenes*.

Kết quả phân tích cũng cho thấy khả năng nhiễm vi khuẩn này trong thực phẩm, nếu thức ăn không được gia nhiệt đầy đủ và bảo quản lạnh dài ngày là những thực phẩm thực sự có nguy cơ nhiễm *L.monocytogenes*. Nhiễm khuẩn *Listeria* thường liên quan đến thực phẩm tươi sống và quá trình chế biến thức ăn, bảo quản lạnh dài ngày. Trong thời gian lưu trữ lạnh, trực khuẩn *Listeria* vẫn sinh trưởng và nhân lên. Hiện nay, khuynh hướng mua lượng lớn thức ăn chế biến bảo quản lạnh tại hộ gia đình để sử dụng cho cả tuần đang tăng vì mua lượng lớn được giảm giá, vì thiếu thời gian đi chợ hàng ngày.

Tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong trên thế giới do *Listeriosis* tăng dần. Tại Việt Nam đã xuất hiện những ca bệnh nhiễm *Listeria* có bệnh cảnh lâm sàng phức tạp, khó chẩn đoán và tiên lượng. Trần Thị Hồng Châu (2010) phát hiện 03 ca nhiễm *Listeria monocytogenes* gây viêm màng não tại Bệnh viện Lâm sàng Nhiệt đới Thành phố Hồ Chí Minh, 2 BN đã tử vong, chẩn đoán xác định bằng nuôi cấy vi khuẩn trong dịch não tủy [8]. Bệnh viện Lâm sàng Quốc gia năm 2010 cũng phát hiện được 1 ca bệnh nhiễm *Listeria monocytogenes*, BN may mắn được cứu sống.

2. Giá trị các phương pháp phát hiện trực khuẩn *Listeria monocytogenes*.

Trong nghiên cứu này, chẩn đoán bằng nuôi cấy, phân lập, xác định đặc tính sinh hóa đã phát hiện 12/160 (7,5%) mẫu nhiễm trực khuẩn *L. monocytogenes*, trong đó 5/40 mẫu xúc xích (12,5%), 3/40 mẫu pa-tê (7,5%), 1/40 mẫu sữa (2,5%) và 3/40 mẫu pho-mát (7,5%). Chẩn đoán bằng nuôi cấy là tiêu chuẩn vàng và là căn cứ quan trọng nhất để định danh các mầm bệnh. Phương pháp nuôi cấy phát hiện *L. monocytogenes* theo tiêu chuẩn 52 TCN - TQTP 0002: 2003 gặp nhiều khó khăn do tính phức tạp và đặc biệt khi cần phân tích sàng lọc một số lượng lớn mẫu.

Phương pháp PCR, hay còn gọi là phương pháp khuếch đại gen. Ưu điểm của phương pháp là có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Ở nước ta, PCR đã được sử dụng rộng rãi để chẩn đoán các bệnh nhiễm trùng như viêm gan virus, HIV, lao... Trong nghiên cứu này, sử dụng kỹ thuật PCR nhằm so sánh với phương pháp kinh điển là nuôi cấy, phân lập, xác định tính chất sinh hóa học, xác định tỷ lệ nhiễm *L. monocytogenes* trong thực phẩm. Bộ kit nested PCR được dùng để xác định *L. monocytogenes* trong thức ăn chế biến bảo quản lạnh. Kết quả cho thấy PCR phát hiện được 17/160 (10,625%) mẫu dương tính với *L. monocytogenes*, trong khi phương pháp nuôi cấy truyền thống chỉ cho 12/160 (7,5%) mẫu dương tính. Giá trị của hai phương pháp phát hiện *L. monocytogenes* khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($\chi^2 = 0,95$ và $p > 0,05$); hệ số Kappa là 0,81, có thể dùng thay thế lẫn nhau, tuy nhiên độ nhạy của kỹ thuật PCR cao hơn.

Kết quả này phù hợp với công bố của Justin O'Grady và CS (2009) nghiên cứu > 175 mẫu thực phẩm bằng kỹ thuật làm giàu kết hợp với RT-PCR cho kết quả độ nhạy 96,15%, độ đặc hiệu 99,4% và độ chính xác 99,3% so với các phương pháp thông thường [6]. Angela

Ingianni và CS (2007) nghiên cứu kết hợp nuôi cấy PCR với kỹ thuật sinh hóa học phát hiện *L. monocytogenes* trong thực phẩm với kết quả: độ đặc hiệu và độ nhạy của PCR 100% ở nồng độ vi khuẩn là 1CFU/2,5g mẫu thực phẩm [4].

Hiện tại Học viện Quân y có thể chế tạo que thử nhanh phát hiện trực khuẩn *L. monocytogenes* dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch màng mỏng. Que thử nhanh là sản phẩm của đề tài cấp Bộ Quốc phòng (nghiệm thu ngày 22 - 12 - 2010) có tính năng tương đương với các sản phẩm của nước ngoài. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng que thử nhanh phát hiện được 11/160 (6,875%) mẫu thức ăn bị nhiễm *L. monocytogenes*. So sánh kết quả phát hiện vi khuẩn *L. monocytogenes* của phương pháp que thử nhanh và nuôi cấy thấy giá trị của hai phương pháp này khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $\chi^2 = 0,05$ và $p > 0,05$; hệ số phù hợp Kappa là 0,95, có thể dùng thay thế lẫn nhau.

KẾT LUẬN

Trong 160 mẫu thức ăn chế biến bảo quản lạnh có thể dùng ăn ngay không cần hâm nóng, bằng phương pháp nuôi cấy đã phát hiện 12/160 (7,5%) mẫu dương tính *L. monocytogenes*. Trong đó, xúc xích 12,5%, pa-tê 7,5%, pho-mát 7,5%, sữa 2,5%.

Phương pháp Nested PCR phát hiện được 17/160 (10,625%) mẫu nhiễm *L. monocytogenes*. Hai phương pháp PCR và nuôi cấy có thể dùng thay thế lẫn nhau với $\chi^2 = 0,95$; $p > 0,05$; Kappa = 0,81. Phương pháp que thử nhanh phát hiện được 11/160 (6,875%) mẫu nhiễm *L. monocytogenes*. Phương pháp nuôi cấy và que thử nhanh có thể dùng thay thế lẫn nhau với $\chi^2 = 0,05$; $p > 0,05$; Kappa = 0,95.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Chi Phương. An toàn thực phẩm: nhiễm khuẩn *Listeria*. Tạp chí Y học Dự phòng. 2005, số 6, tr.97-99.
2. Nguyễn Minh Thực và CS. Bước đầu khảo sát nhiễm *Listeria monocytogenes* trong một số thực phẩm trên thị trường Hà Nội bằng kỹ thuật PCR. Tạp chí Khoa học và Công nghệ. 2008, tập 46, số 2, tr.67-77.
3. Nguyễn Thị Kim Hoa và CS. Ứng dụng kỹ thuật PCR trong phát hiện nhanh *Listeria monocytogenes*. Tạp chí Khoa học và Công nghệ. 2005, tập 43, số 4, tr.37-45.
4. Angela Ingianni và CS. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in processed meat by a combined cultural-molecular method. American journal of infectious diseases. 2007, 3 (3), pp.159- 164.
5. Gallagher L., Ebel E.D., Kause J.R. Draft FSIS risk assessment for *Listeria*, ready-to-eat meat and poultry products. Food safety and inspection service. Washington D.C. 2003.
6. Justin O'Grady. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR. Food Micro. 2009, 26 (1), pp.4-7.

7. Landis J.R, Koch G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 33 (1), pp.159-174.

8. Tran Thi Hong Chau et al. Three adult cases of Listeria monocytogenes Meningitis in Vietnam. PLoS Medicine. 2010, Vol 7,pp.1-6.

9. http://www.pasteur-hcm.org.vn/tinchitiet.jsp?ma_bv=146

10. <http://www.yhth.vn/Detail/1928/cuu-song-bn-nhiem-khuan-listeria-monocitogenes.htm>.