

XÁC ĐỊNH TỶ LỆ VI KHUẨN VEROTOXIGENIC *E. COLI* (VTEC) TRONG MẪU THỊT TẠI CHỢ, LÒ MỔ TRÊN ĐỊA BÀN HÀ NỘI

Determination of Prevalence of Verotoxigenic *E.coli* (VTEC) Bacteria in Meat Samples Collected from Market Places and Slaughterhouses in Hanoi Area

Nguyễn Thị Thanh Thủy¹, Đỗ Ngọc Thúy², Lưu Thị Hải Yến², Nguyễn Bá Hiên³

¹ *Nghiên cứu sinh, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

² *Viện Thú y quốc gia*

³ *Khoa Thú y, Trường Đại học Nông Nghiệp Hà Nội*

Địa chỉ email tác giả liên hệ: thuy.raho1@gmail.com

Ngày gửi bài: 30.10.2011; Ngày chấp nhận: 29.11.2011

TÓM TẮT

Việc xác định vi khuẩn VTEC trong thực phẩm là rất cần thiết, nhằm hạn chế khả năng gây bệnh của chúng thông qua thức ăn có nguồn gốc động vật. Quy trình xác định vi khuẩn VTEC trong thịt bằng kỹ thuật PCR (Polymerase chain reaction) được sử dụng trong nghiên cứu này. Kết quả, tỷ lệ vi khuẩn VTEC phân lập được trong 75 mẫu thịt tại chợ và 30 mẫu tại lò mổ trên địa bàn Hà Nội lần lượt là 31% và 10%. Các chủng vi khuẩn phân lập được đã được xác định là thuộc về một số nhóm huyết thanh có khả năng gây ngộ độc thực phẩm ở người.

Từ khóa: Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC), PCR (Polymerase chain reaction), mẫu thịt.

ABSTRACT

The identification of verotoxigenic *E.coli* (VTEC) bacteria in food is essential to limit their ability to cause disease through foods of animal origin. The process of identifying VTEC bacteria in meat using PCR (Polymerase chain reaction) was applied in this study. The prevalence of VTEC isolated from 75 meat samples taken from markets and 30 samples from slaughterhouses in Hanoi area was 31% and 10%, respectively. Isolates determined belonged to a number of serogroups which can cause food poisoning in humans.

Keywords: Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC), PCR (Polymerase chain reaction), meat samples.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Verotoxigenic *E.coli* (VTEC) là khái niệm dùng để chỉ nhóm các vi khuẩn *E.coli* có khả năng sản sinh ra độc tố Verotoxin hoặc Shigalike toxin. VTEC có khả năng sản sinh ra 2 loại độc tố Verotoxin chính là VT1 và VT2. Ngoài ra, một yếu tố độc lực khác cũng đóng vai trò quan trọng, đó là yếu tố intimin - một loại protein màng ngoài (OMP) giúp vi khuẩn bám dính và xâm nhập vào các tế bào biểu mô (A/E) (Hanna, 1997).

Phần lớn các vụ ngộ độc do VTEC ở người, đặc biệt là các vụ do O157:H7 đã được xác định là có liên quan đến việc ăn bánh mì kẹp nhân thịt bò chưa được nấu chín kỹ hoặc do uống sữa tươi. Các vi khuẩn thuộc nhóm VTEC đã được xác định là nguyên nhân làm lây truyền các bệnh do vi khuẩn này gây nên (Beutin và cs., 1993).

Ở nhiều quốc gia, VTEC là tác nhân gây bệnh tiêu chảy rất hay gặp ở người (Wachsmuth, 1994). Trong đó *E.coli* O157:H7 là nhóm đại diện điển hình nhất. Ở

động vật, VTEC là nguyên nhân gây ra chứng viêm ruột xuất huyết và tiêu chảy ở bò, gây phù đầu ở lợn (Lingood and Thompson, 1987).

Việc xác định tỷ lệ vi khuẩn thuộc nhóm này là rất cần thiết, do mối nguy hại của vi khuẩn này liên quan đến các nạn dịch tiêu chảy trầm trọng ở người và khả năng truyền lây bệnh của chúng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định tỷ lệ vi khuẩn VTEC trong mẫu thịt tại một số lò mổ, chợ trên địa bàn Hà Nội nhằm đánh giá mức độ lưu hành của vi khuẩn VTEC và khả năng lây nhiễm của chúng sang thực phẩm dùng làm thức ăn cho con người.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Mẫu lau thân thịt được lấy tại các lò mổ trên địa bàn Hà Nội. Mẫu thịt các loại (lợn, bò, gà) được mua ngẫu nhiên tại các chợ.

Các môi trường thông thường và đặc hiệu gồm: Thạch máu, thạch thường, thạch macConkey, thạch CT-SMAC, thạch EMB, nutrient broth, IB broth, BHI broth,... dùng để nuôi cấy và giám định vi khuẩn VTEC.

Các hóa chất, sinh phẩm gồm: AMPx5 bufer, dNTP stock, 50xTAE, Tap-DNA polymerase, primer, gel loading bufer, ethidium bromide cho phản ứng PCR.

Các chủng vi khuẩn đối chứng dương và âm do Viện nghiên cứu y (NVRI), Ba Lan; phòng thí nghiệm tham chiếu vi khuẩn *E. coli* của OIE, Canada cung cấp cho phản ứng PCR.

Các kháng huyết thanh đa giá và đơn giá dùng để xác định kháng nguyên O của vi khuẩn *E.coli*.

2.2. Phương pháp

- Phương pháp lấy mẫu:

75 mẫu thịt lợn, thịt bò, thịt gà được mua ngẫu nhiên tại một số chợ trên địa bàn

Hà Nội. Mẫu được lấy vào buổi sáng (6-7 giờ), bảo quản ở nhiệt độ 4-8°C và chuyển về phòng thí nghiệm để xử lý mẫu trong cùng ngày. Các chợ được chọn lấy mẫu gồm chợ Thành Công, Bách Khoa, chợ Hôm và chợ Tựu Liệt. Đây là những chợ tập trung đông người dân mua bán thực phẩm tươi sống tại Hà Nội.

30 mẫu lau thân thịt của lợn, bò tại lò mổ được lấy theo phương pháp dùng gạc vô trùng lau 4 vị trí (cổ, lưng, bụng và mông), 100cm²/vị trí. Sau khi lau, gạc được đặt vào lọ có chứa 20ml môi trường mTSB. Các mẫu này được lấy tại lò mổ Minh Hiền và Trung Văn trên địa bàn Hà Nội.

- Phương pháp phân lập và giám định vi khuẩn:

Từ các mẫu thu thập được, chúng tôi tiến hành phân lập và giám định vi khuẩn VTEC theo quy trình phân lập vi khuẩn VTEC trong mẫu thịt tươi đã được thiết lập tại Bộ môn vi trùng, Viện thú y (Đề tài cấp cơ sở năm 2010)

Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction) sử dụng nhiều cặp mồi VT1-F, VT1-R, VT2-F, VT2-R, eae-F, eae-R để phát hiện các gen VT1, VT2 và eae của vi khuẩn VTEC.

Phương pháp xác định serotyp kháng nguyên O của vi khuẩn *E.coli* bằng ngưng kết nhanh trên phiến kính. Các kháng huyết thanh chuẩn dùng để xác định serotyp O (đa giá và đơn giá) do hãng Denka (Seiken Co., Ltd, Niigata, Nhật Bản) sản xuất. Các chủng vi khuẩn được tiến hành xác định nhóm với huyết thanh đa giá trước, sau đó đến các huyết thanh đơn giá trong nhóm.

- Phương pháp xử lý số liệu:

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Xác định vi khuẩn VTEC có trong các mẫu thịt thu thập từ các chợ và lò mổ

Quy trình trên đã được áp dụng để xác định sự có mặt của vi khuẩn VTEC có trong các mẫu thịt thu thập từ các chợ, lò mổ trên địa bàn Hà Nội. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Như vậy, VTEC được phân lập từ các mẫu thịt lấy tại các chợ chiếm tỷ lệ 31% và từ mẫu lau thân thịt lấy từ các lò mổ chiếm tỷ lệ 10% (Bảng 1).

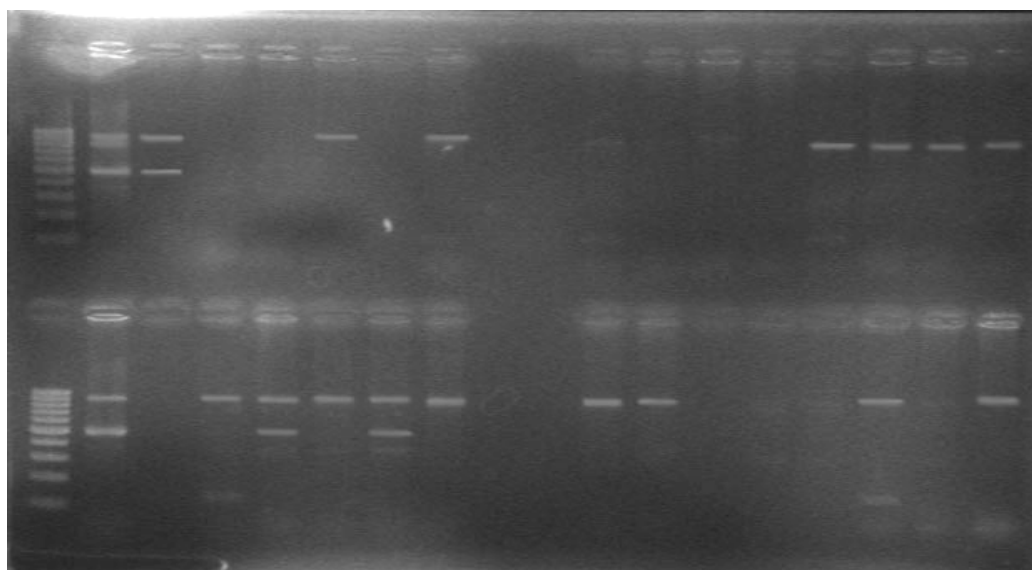
Các chủng này đã được xác định là VTEC do:

- Có mang các tính chất sinh hóa đặc trưng của vi khuẩn *E.coli*
- Có mang ít nhất 1 trong số 3 loại gen (VT1, VT2, và eae) bằng phản ứng PCR.

Bảng 1. Tỷ lệ phân lập vi khuẩn VTEC từ các mẫu thịt

Loại thịt	Nguồn gốc			
	Chợ (n=75)		Lò mổ (n=30)	
	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ %	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ %
Thịt lợn (n=45)	9	36,0	2	10,0
Thịt bò (n=30)	5	25,0	1	10,0
Thịt gà (n=30)	9	30,0	0	0
Tổng số	23	31,0	3	10,0

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Hình 1. Các sản phẩm của phản ứng PCR với các chủng phân lập từ các mẫu thịt sau quá trình điện di

Ghi chú: Hàng trên: M: 75 bp marker. Giếng 1: FD635 (VT1/VT2/eae). Giếng 2: FD523 (VT1/VT2). Giếng 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11: Chủng phân lập (âm tính). Giếng 5, 7, 12, 13, 14 và 15: Chủng phân lập (VT1). Hàng dưới: M: 75 bp marker. Giếng 1, 4, 6: Chủng phân lập (VT1/VT2). Giếng 2, 10, 11, 12: Chủng phân lập (âm tính). Giếng 3, 5, 7, 8, 9, 13 và 15: Chủng phân lập (VT1).

Trong các mẫu thịt lấy từ chợ: Tỷ lệ phân lập được VTEC từ thịt lợn chiếm tỷ lệ cao hơn (36%) so với thịt gà (30%) và thịt bò (25%). Hay nói cách khác, tỷ lệ thịt lợn bị nhiễm với VTEC là cao hơn hẳn so với thịt bò. Trong số 30 mẫu thu thập từ lò mổ, có 3 mẫu dương tính, chiếm tỷ lệ 10%.

Đến nay vẫn chưa có một công trình nghiên cứu nào công bố tỷ lệ nhiễm VTEC trên thịt tại Việt Nam, ngoài một nghiên cứu của Vu-Khac H và cs. (2008) trên 568 mẫu phân trâu, bò và dê khỏe nuôi tại các trại thuộc các tỉnh miền Trung đã xác

định được tỷ lệ nhiễm VTEC ở trâu là 27%, bò là 23% và dê là 38,5%. Tuy nhiên, do dung lượng mẫu điều tra chưa nhiều, nên kết quả trong nghiên cứu này chỉ mang tính chất tham khảo về tỷ lệ nhiễm VTEC đang lưu hành tại chợ, lò mổ trên địa bàn Hà Nội.

3.2. Kết quả xác định serotyp của các chủng vi khuẩn VTEC phân lập

Kết quả xác định serotyp của các chủng vi khuẩn phân lập được với 9 nhóm huyết thanh O đa giá, được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định serotyp của các chủng VTEC phân lập được

Nguồn gốc chủng STEC	Kết quả			
	Serotyp	Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)	
Chợ	O1	1	11,1	
	O8	1	11,1	
	O18	1	11,1	
	O103	1	11,1	
	Thịt lợn (n=9)	O143	1	11,1
		O148	1	11,1
		O159	1	11,1
		O166	1	11,1
		KXD	1	11,1
		O8	4	80,0
Thịt bò (n=5)	O125	1	20,0	
	O1	1	11,1	
Thịt gà (n=9)	O15	2	22,2	
	O28ae	1	11,1	
	O152	2	22,2	
	O158	1	11,1	
	O169	2	22,2	
Lò mổ	Thịt lợn (n=2)	O103	2	100,0
	Thịt bò (n=1)	O8	1	100,0

Ghi chú: KXD: Không xác định với 9 nhóm huyết thanh đa giá

Kết quả xác định serotyp kháng nguyên O của 26 chủng VTEC phân lập được cho thấy các chủng VTEC thuộc về 14 nhóm kháng nguyên O khác nhau, nhưng không có chủng nào được xác định là thuộc nhóm O157, O111 hay O26, là 3 trong số các serotyp đã được xác định là thường gây ra các vụ ngộ độc và một số các chứng bệnh khác trên người như viêm ruột xuất huyết (H C - Haemorrhagiccolitis), huyết niệu (H US - H aemolytic ureamic syndrome) và ban xuất huyết giảm tiểu cầu (TTP - Thrombotic thrombocytopenic purpura) do ăn phải thực phẩm bị ô nhiễm (Phạm Thị Tâm và cs., 2009, trích dẫn theo Griffin, 1995).

Các kết quả giám định các đặc tính sinh vật hóa học của 26 chủng VTEC được trình bày ở bảng 3.

Các kết quả nuôi cấy và giám định đặc tính sinh hóa của 26 chủng vi khuẩn VTEC, đặc biệt là trên môi trường CT-SMAC cũng đã khẳng định một lần nữa các kết quả này là hoàn toàn phù hợp.

Điều đáng lưu ý là 2 loại serotyp O8 và O103 đã được phát hiện trong số các chủng có nguồn gốc từ thịt lợn và thịt bò. Chúng thuộc trong số 8 nhóm serotyp các serotyp thường gây tiêu chảy xuất huyết ở bò và có khả năng lây sang người, đó là các serotyp O5, O8, O20, O26, O103, O111, O118, O145 và có mang một hoặc cả hai loại độc tố VT1, VT2.

Vu-Khac H và cs (2008) cũng đã cho thấy: chỉ có 9/173 chủng VTEC chiếm 5% từ phân của loài nhai lại (trâu, bò, dê) nuôi tại các tỉnh miền Trung thuộc về 5 serotyp là O26, O91, O121, O145 và O157.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra các đặc tính của vi khuẩn *E.coli* phân lập được

TT	Loại phản ứng	Số chủng dương tính/Tổng số chủng kiểm tra	Tỷ lệ (%)
1	Gram âm	26/26	100
2	Di động	26/26	100
3	Indol	26/26	100
4	MR	26/26	100
5	VP	0/26	0
6	H2S	0/26	0
7	Citrat	0/26	0
<i>Đặc tính lên men đường</i>			
8	Lactose	26/26	100
9	Mannit	26/26	100
10	Manitol	26/26	100
11	Glucose	26/26	100
12	Xylose	26/26	100
13	Galactose	26/26	100
14	Fructose	26/26	100
15	Saccharose	9/26	34,6
16	Arabinose	0/26	0

4. KẾT LUẬN

Phân lập 75 mẫu thịt tại chợ và 30 mẫu tại lò mổ trên địa bàn Hà Nội cho tỷ lệ dương tính với vi khuẩn VTEC lần lượt là 31% và 10%. Trong các mẫu thịt lấy tại chợ, tỷ lệ phân lập được VTEC từ thịt lợn chiếm tỷ lệ cao hơn (36%) so với thịt gà (30%) và thịt bò (25%).

Xác định serotyp kháng nguyên O của 26 chủng VTEC phân lập được cho thấy các chủng VTEC thuộc về 14 nhóm kháng nguyên O khác nhau, nhưng không có chủng nào được xác định là thuộc nhóm O157, O111 hay O26.

Từ nghiên cứu này cho phép xây dựng một quy trình xác định vi khuẩn VTEC trong thực phẩm. Nhằm loại bỏ hoặc tiêu hủy kịp thời thực phẩm có nhiễm mầm bệnh VTEC hoặc xác định nguyên nhân các vụ ngộ độc thực phẩm do VTEC gây ra.

Hiểu biết về các đặc tính của vi khuẩn VTEC trong các loại thực phẩm cho con người có ý nghĩa quan trọng trong việc đưa ra hệ thống cảnh báo sớm và tiến hành các biện pháp phòng chống bệnh thích hợp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Phạm Thị Tâm, Phạm Công Hoạt, Trần Thị Hạnh, Tô Long Thành và Lê Văn Nhung (2009). “Nghiên cứu chế tạo và lựa chọn kháng nguyên của vi khuẩn *E.coli* O157:H7 phục vụ thiết lập phản ứng ELISA”, Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y, Tập XVI (5), tr.11-15.
- Beutin L., Geier D., Steinruck H., Zimmermann S. And Scheuts F. (1993). “Prevalence and some properties of Verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals”, *Journal of Clinical Microbiology*, 31(9), p.2483-2488.
- Hanna Evelina Sidjabat - Tambunan (1997), “Verocytotoxin producing *Escherichia coli* in food-producing animals”, *The degree of master of veterinary science*, The University of Queensland, Australia.
- Linggood MA, Thompson JM. (1987), “Verotoxin production among porcine strains of *Escherichia coli* and its association with oedema disease”, *J Med Microbiol.* Dec;24(4):359-62.
- Vu-Khac H, Cornick NA.(2008), “Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam”, *Vet Microbiol.* 126(4):356-63.
- Wachsmuth. (1994). Summary: Public Health, epidemiology; food safety, laboratory diagnosis, “*In: recent advances in Verocytotoxin-producing Escherichia coli infection*”, Karmali, M.A. and Goglio, A.g.(eds). Elsevier. Amsterdam.pp 3-6.