

BỘ GIÁO DỤC & ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

ĐẶNG THỊ MAI LAN

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH TỶ LỆ NHIỄM VÀ ĐỘC TỔ
ĐƯỜNG RUỘT (ENTEROTOXIN) CỦA VI KHUẨN *Listeria*,
Salmonella spp., *Staphylococcus aureus* Ô NHIỄM TRONG
THỊT LỢN Ở MỘT SỐ TỈNH PHÍA BẮC**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ THÚ Y

Thái Nguyên, năm 2017

BỘ GIÁO DỤC & ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

ĐẶNG THỊ MAI LAN

**NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH TỶ LỆ NHIỄM VÀ ĐỘC TỔ
ĐƯỜNG RUỘT (ENTEROTOXIN) CỦA VI KHUẨN *Listeria*,
Salmonella spp., *Staphylococcus aureus* Ô NHIỄM TRONG
THỊT LỢN Ở MỘT SỐ TỈNH PHÍA BẮC**

Chuyên ngành: Ký sinh trùng & VSV học thú y
Mã số: 62.64.01.04

LUẬN ÁN TIẾN SĨ THÚ Y

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Đặng Xuân Bình
2. PGS.TS. Nghiêm Ngọc Minh

Thái Nguyên, năm 2017

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi được thực hiện với sự giúp đỡ của:

- Ths. Phạm Thị Phương Lan cùng các anh, chị, em Bộ môn Công nghệ vi sinh - Viện Khoa học sự sống - Đại học Thái Nguyên.

- Ths. Nguyễn Thị Hoài Thu cùng toàn thể các anh, chị, em phòng Công nghệ sinh học môi trường và phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen - Viện Công nghệ sinh học.

Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin cam đoan rằng các thông tin trích dẫn trong luận án đều đã được chỉ rõ nguồn gốc.

Thái Nguyên, ngày tháng năm 2017

Tác giả

Đặng Thị Mai Lan

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, cùng với sự nỗ lực, cố gắng của bản thân, tôi xin được đặc biệt bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới thầy: PGS.TS. Đặng Xuân Bình và PGS.TS. Nghiêm Ngọc Minh, người đã trực tiếp hướng dẫn và truyền đạt nhiều kinh nghiệm quý báu cho tôi trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin được chân thành cảm ơn tới Ths. Phạm Thị Phương Lan cùng các anh, chị, em Bộ môn Công nghệ vi sinh - Viện Khoa học sự sống - Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện cho tôi hoàn thành luận án này.

Tôi cũng xin được gửi lời cảm ơn tới Ths. Nguyễn Thị Hoài Thu cùng toàn thể các anh, chị, em phòng Công nghệ sinh học môi trường và phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen - Viện Công nghệ sinh học cũng đã tận tình giúp đỡ và tạo điều kiện để cho tôi trong quá trình nghiên cứu và hoàn thiện luận án.

Nhân dịp này tôi cũng xin trân trọng cảm ơn Ban Giám hiệu nhà trường, Ban Chủ nhiệm Khoa Chăn nuôi Thú y, các thầy cô, các anh chị em đồng nghiệp khoa Chăn nuôi Thú y, Lãnh đạo Chi cục Thú y, Trạm thú y các tỉnh Thái Nguyên, Bắc Giang, Hà Tây - Hà Nội, Vĩnh Phúc đã luôn tạo điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành luận án.

Lời sau cùng, xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới những người bạn, người thân trong gia đình và nhất là bố, mẹ đã luôn kịp thời động viên và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất để tôi hoàn thành luận án. Xin cảm ơn người chồng thân yêu đã luôn giúp đỡ, chia sẻ với tôi trong suốt những năm tháng qua.

Xin trân trọng cảm ơn tất cả sự giúp đỡ quý báu này.

Thái Nguyên, ngày tháng năm 2017

Đặng Thị Mai Lan

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT	viii
DANH MỤC CÁC BẢNG, BIỂU	x
DANH MỤC CÁC HÌNH	xii
MỞ ĐẦU	1
1. Tính cấp thiết của đề tài	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài	2
3.1. Ý nghĩa khoa học	2
3.2. Ý nghĩa thực tiễn	2
4. Điểm mới của đề tài	2
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Tình hình ngộ độc thực phẩm do nhiễm vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>Staphylococcus aureus</i> thế giới và Việt Nam.....	3
1.1.1. Tình hình ngộ độc thực phẩm do nhiễm vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> trên thế giới.....	3
1.1.2. Tình hình ngộ độc thực phẩm do nhiễm vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> tại Việt Nam	5
1.2. Ngộ độc thực phẩm do nhiễm <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>S. aureus</i> và nguyên nhân gây nhiễm khuẩn vào thịt lợn.....	9
1.2.1. Khái niệm ngộ độc và phân loại tình trạng ngộ độc	9
1.2.2. Ngộ độc thực phẩm do <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i>	9
1.2.3. Nguyên nhân gây nhiễm khuẩn vào thịt.....	11
1.3. Đặc điểm sinh vật, hóa học của một số vi khuẩn gây ô nhiễm trên thịt lợn	14
1.3.1. Sơ đồ phân lập vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i>	14
1.3.2. Đặc điểm sinh vật, hóa học của vi khuẩn <i>Listeria</i>	18
1.3.3. Đặc điểm sinh vật, hóa học của vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp.	20
1.3.4. Đặc điểm sinh vật, hóa học của vi khuẩn <i>S. aureus</i>	25

1.4. Các yếu tố độc lực của vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i>	29
1.4.1. Các yếu tố độc lực của vi khuẩn <i>Listeria</i>	29
1.4.2. Các yếu tố độc lực của vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp.....	30
1.4.3. Các yếu tố độc lực của vi khuẩn <i>S. aureus</i>	35
1.5. Gen sản sinh độc tố đường ruột của vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i>	39
1.5.1. Gen sản sinh độc tố đường ruột của <i>Salmonella</i> spp.	39
1.5.2. Gen sản sinh độc tố đường ruột của <i>S. aureus</i>	41
1.6. Biện pháp phòng chống ngộ độc thực phẩm.....	44
1.6.1. Giải pháp trước mắt.....	44
1.6.2. Giải pháp lâu dài	46
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP	
NGHIÊN CỨU.....	47
2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.....	47
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	47
2.1.2. Địa điểm nghiên cứu	47
2.1.3. Thời gian nghiên cứu: Từ năm 2012 đến năm 2015	47
2.2. Vật liệu nghiên cứu.....	47
2.2.1. Động vật thí nghiệm.....	47
2.2.2. Các loại môi trường, hóa chất và thiết bị sử dụng trong quá trình nghiên cứu	47
2.3. Nội dung nghiên cứu	49
2.3.1. Xác định tỷ lệ nhiễm và đặc tính sinh học của vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> trong thịt lợn tươi bán tại chợ Trung tâm của một số tỉnh phía Bắc	49
2.3.2. Xác định serovar các chủng <i>Salmonella</i> spp. phân lập được bằng phương pháp ngưng kết nhanh trên phiến kính	49
2.3.3. Xác định khả năng sản sinh độc tố đường ruột của vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> bằng “Phản ứng khuếch tán trong da thỏ”.....	49
2.3.4. Xác định gen sản sinh độc tố enterotoxin của vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> phân lập được	49
2.4. Phương pháp nghiên cứu	49
2.4.1. Phương pháp lấy mẫu.....	49

2.4.2. Phương pháp xác định chỉ tiêu vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> nhiễm trong thịt lợn.....	50
2.4.3. Phương pháp nhuộm Gram xác định hình thái vi khuẩn	52
2.4.4. Phương pháp xác định các đặc tính sinh hóa của các chủng <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> đã phân lập được	52
2.4.5. Phương pháp xác định độc lực của các chủng vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> phân lập được trên chuột thí nghiệm	55
2.4.6. Phương pháp xác định tính miễn cảm với một số loại kháng sinh của chủng vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> phân lập được	56
2.4.7. Phương pháp xác định serovar của vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. phân lập được	57
2.4.8. Phương pháp xác định khả năng sản sinh độc tố đường ruột của vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> bằng “Phản ứng khuếch tán trong da thỏ”	57
2.4.9. Phương pháp xác định gen sản sinh độc tố đường ruột enterotoxin của vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> bằng phương pháp PCR	58
2.4.10. Phương pháp đọc trình tự ADN trên máy đọc tự động và phân tích kết quả bằng phần mềm chuyên dụng đối với vi khuẩn <i>S. aureus</i>	61
2.4.11. Phương pháp biểu hiện và tinh sạch gen <i>seb</i> 534 của vi khuẩn <i>S. aureus</i> ..	61
2.5. Phương pháp xử lý số liệu	62
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	63
3.1. Tình hình tiêu thụ và tỷ lệ nhiễm khuẩn trong thịt lợn ở một số tỉnh phía Bắc	63
3.1.1. Khảo sát tình hình giết mổ lợn trên địa bàn một số tỉnh phía Bắc	63
3.1.2. Xác định tỷ lệ nhiễm vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> trong thịt lợn bán tại chợ Trung tâm của tỉnh Thái Nguyên, Bắc Giang, Hà Tây - Hà Nội và Vĩnh Phúc	64
3.2. Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>S. aureus</i> trong thịt lợn bán tại chợ Trung tâm của tỉnh Thái Nguyên, Bắc Giang, Hà Tây - Hà Nội, Vĩnh Phúc	66
3.2.1. Kết quả tỷ lệ nhiễm vi khuẩn <i>Listeria</i> trong thịt lợn.....	66
3.2.2. Kết quả tỷ lệ nhiễm vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. trong thịt lợn.....	67
3.2.3. Kết quả tỷ lệ nhiễm vi khuẩn <i>S. aureus</i> trong thịt lợn	68
3.3. Xác định chỉ tiêu vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>S. aureus</i> nhiễm trong thịt lợn bán tại các chợ.....	69
3.3.1. Xác định chỉ tiêu vi khuẩn <i>Listeria</i> nhiễm trong thịt lợn.....	69

3.3.2. Xác định chỉ tiêu vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. nhiễm trong thịt lợn.....	70
3.3.3. Xác định chỉ tiêu vi khuẩn <i>S. aureus</i> nhiễm trong thịt lợn	71
3.4. Xác định tỷ lệ vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>S. aureus</i> nhiễm trong thịt lợn theo thời gian lấy mẫu sau bán hàng.....	73
3.4.1. Xác định tỷ lệ vi khuẩn <i>Listeria</i> nhiễm trong thịt lợn theo thời gian lấy mẫu ..	73
3.4.2. Xác định tỷ lệ vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. nhiễm trong thịt lợn theo thời gian lấy mẫu	75
3.4.3. Xác định tỷ lệ vi khuẩn <i>S. aureus</i> nhiễm trong thịt lợn theo thời gian lấy mẫu....	78
3.5. Tỷ lệ và cường độ nhiễm vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>S. aureus</i> trong thịt lợn theo mùa	80
3.5.1. Tỷ lệ và cường độ nhiễm vi khuẩn <i>Listeria</i> trong thịt lợn theo mùa.....	80
3.5.2. Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. trong thịt lợn theo mùa	83
3.5.3. Tỷ lệ và cường độ nhiễm vi khuẩn <i>S. aureus</i> trong thịt lợn theo mùa.....	86
3.6. Giám định đặc tính sinh vật, hóa học của các chủng vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> phân lập được.....	90
3.6.1. Giám định đặc tính sinh vật, hóa học của các chủng vi khuẩn <i>Listeria</i> phân lập được.....	90
3.6.2. Giám định đặc tính sinh vật, hóa học của các chủng vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. phân lập được.....	91
3.6.3. Giám định đặc tính sinh vật, hóa học của các chủng vi khuẩn <i>S. aureus</i> phân lập được	92
3.7. Thử độc lực của các chủng vi khuẩn <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> phân lập được trên chuột thí nghiệm	93
3.7.1. Kết quả thử độc lực của các chủng vi khuẩn <i>Listeria</i> phân lập được trên chuột thí nghiệm.....	93
3.7.2. Kết quả thử độc lực của các chủng vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. phân lập được trên chuột thí nghiệm	94
3.7.3. Kết quả thử độc lực của các chủng vi khuẩn <i>S. aureus</i> phân lập được trên chuột thí nghiệm.....	95
3.8. Kiểm tra tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> phân lập được	97

3.8.1. Kết quả kiểm tra tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng <i>Listeria</i> phân lập được	97
3.8.2. Kết quả kiểm tra tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng <i>Salmonella</i> spp. phân lập được.....	98
3.8.3. Kết quả kiểm tra tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng <i>S. aureus</i> phân lập được	99
3.9. Kết quả xác định khả năng sản sinh độc tố đường ruột của vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> bằng “Phản ứng khuếch tán trong da thỏ”	100
3.9.1. Kết quả xác định khả năng sản sinh độc tố đường ruột của vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp. bằng “Phản ứng khuếch tán trong da thỏ”	100
3.9.2. Kết quả xác định khả năng sản sinh độc tố đường ruột của vi khuẩn <i>S. aureus</i> bằng “Phản ứng khuếch tán trong da thỏ”	102
3.10. Kết quả xác định serovar các chủng <i>Salmonella</i> spp. phân lập được bằng phương pháp ngưng kết nhanh trên phiến kính theo sơ đồ của Kauffmann - White.....	103
3.11. Xác định gen sản sinh độc tố đường ruột enterotoxin của chủng <i>Salmonella</i> spp. và <i>S. aureus</i> phân lập được	104
3.11.1. Gen sản sinh độc tố đường ruột enterotoxin của vi khuẩn <i>Salmonella</i> spp.	105
3.11.2. Gen sản sinh độc tố đường ruột enterotoxin nhóm B của vi khuẩn <i>S. aureus</i> .	107
3.12. Đề xuất một số biện pháp phòng ngừa.....	118
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	120
1. Kết luận	120
2. Kiến nghị.....	121
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	122
TÀI LIỆU THAM KHẢO	123
I. Tài liệu tiếng Việt.....	123
II. Tài liệu Tiếng Anh	129
III. Tài liệu Internet.....	137
PHỤ LỤC.....	139

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

APS:	Ammoniumpersulfate
AOAC:	Association of Official Agricultural Chemists
bp:	base pair (cặp base)
<i>C. perfringens</i> :	<i>Clostridium perfringens</i>
DBB:	Denaturing Binding Buffer
DEB:	Denaturing Elution Buffer
ADN:	Acid deoxyribonucleic
dNTPs:	deoxynucleotide triphosphate
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
Epp:	Eppendorf
IPTG:	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB:	Luria and Bertani
MHC II:	Histocompatibility complex class II
MRSA:	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA:	Methicillin- sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
NCBI:	Ngân hàng gen
NĐTP:	Ngộ độc thực phẩm
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PBS:	Phosphate buffer saline
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCC:	Staphylococcal chromosomal cassette
SDS:	Sodium dodecyl sulfat
<i>se</i> :	Staphylococcal enterotoxin
<i>sea</i> :	Staphylococcal enterotoxin A
<i>seb</i> :	Staphylococcal enterotoxin B
<i>sec</i> :	Staphylococcal enterotoxin C
<i>sed</i> :	Staphylococcal enterotoxin D
<i>see</i> :	Staphylococcal enterotoxin E
<i>ses</i> :	Staphylococcal enterotoxin S