

Sự lưu hành vi khuẩn *Clostridium perfringens* và *Clostridium difficile* mang gen sinh độc tố *cpa*, *tcdA* trong thịt và rau ăn lá

Tạ Thị Yến*, Ninh Thị Hạnh, Vũ Thị Hải Hà, Phạm Văn Quân, Nguyễn Thành Trung

Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Chi *Clostridium* là các trực khuẩn Gram dương, sinh bào tử. Hầu hết các loài vi khuẩn *Clostridia* spp. thường xuất hiện trong đất, nước, xác thực vật, xác động vật, và đóng một phần quan trọng trong các quá trình phân huỷ các chất trong tự nhiên. Thực phẩm tươi có nguồn gốc động vật và thực vật có nhiều khả năng bị nhiễm bào tử hoặc tế bào sinh dưỡng thuộc chi *Clostridium*. Kết quả nghiên cứu ghi nhận tỉ lệ mẫu nhiễm thịt tươi và rau ăn lá thu thập tại các chợ thuộc Quận Đống Đa, Hà Đông, Hoàng Mai nhiễm *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) là 26,67% (n = 150) và 26,82% (n = 220). Tỉ lệ mẫu thịt và rau nhiễm *Clostridium difficile* (*C. Difficile*) là rất thấp với 6,0% (n = 150) và 0,9% (n = 220) mẫu thịt tươi và mẫu rau ăn lá tương ứng. Các phản ứng khuếch đại gen cho thấy sự hiện diện của gen *cpa* trong tất cả các chủng *C. perfringens* và phát hiện 2 chủng *C. difficile* mang gen *tcdA*.

Từ khóa: *Clostridium perfringens* và *Clostridium difficile*, gen *cpa*, gen *tcdA*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các mầm bệnh truyền qua thực phẩm là một thách thức lớn đối với sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới. Trong số các loài vi khuẩn truyền qua thực phẩm thì các vi khuẩn thuộc chi *Clostridium* gây bệnh thông qua việc sản xuất các độc tố tác động lên đường tiêu hóa gây tiêu chảy và co thắt. Cũng giống như một số loài vi khuẩn khác, vi khuẩn thuộc chi *Clostridium* thường xuất hiện trong đất, nước, xác thực vật, xác động vật, do đó thực phẩm có nguồn gốc động vật hoặc thực vật có khả năng cao bị nhiễm *Clostridium* sp. từ môi trường sống. Ngoài ra, thực phẩm có thể bị ô nhiễm tại môi trường, trong quá trình chế biến hoặc trong các giai đoạn khác trong chuỗi sản xuất thực phẩm do lây nhiễm chéo. Yếu tố chính gây nhiễm *Clostridium* vào thực phẩm có nguồn gốc động vật là do nhiễm trong quá trình giết mổ và chế biến. Cây trồng bị nhiễm *Clostridium* thường do ô nhiễm đất, quá trình rửa và làm sạch không đúng qui trình. Ngoài ra, việc không tuân thủ các quy định về bảo quản sản phẩm riêng biệt có thể gây nhiễm chéo giữa các nguồn nguyên liệu thực phẩm thô với nhau.

Trong các loài vi khuẩn thuộc chi *Clostridium* thì *C. perfringens* và *C. difficile* có khả năng gây bệnh lên đường tiêu hóa đã được phân lập từ đất, nước và thực phẩm bao

*Điện thoại: 0904959050

Email: yentt@nifc.gov.vn

gồm thịt và rau ăn lá làm đẩy lên lo ngại thực phẩm có thể là nguồn lây nhiễm tiềm ẩn gây bệnh cho con người. Các báo cáo cho thấy *C. perfringens* là một trong các loài vi khuẩn gây ra các vụ ngộ độc thực phẩm trên người và trong các báo cáo gần đây cũng đã chỉ ra sự hiện diện của *C. perfringens* mang gen gây độc trên các mẫu thực phẩm như thịt tươi và rau ăn sống.

Rau và thịt là nguồn thực phẩm phổ biến trong cuộc sống hằng ngày của người Việt Nam. Theo báo cáo của Ngân hàng thế giới vào năm 2017, tỉ lệ tiêu thụ rau tại Việt Nam là 0.4 kg rau mỗi ngày trên người và tỉ lệ tiêu thụ rau tại Hà Nội là 2.800 tấn mỗi ngày [1]. Theo Niên giám thống kê năm 2019, sản lượng giết mổ và bán ra của gia cầm, thịt lợn tại Hà Nội là 1.302,5 và 3.328,8 nghìn tấn [2]. Từ đó cho thấy rau và thịt là nguồn tiêu thụ chính cho nhu cầu ăn uống hằng ngày của người dân Hà Nội. Cũng như các loại thực phẩm khác, thịt và rau là nguồn chứa vi sinh vật gây bệnh, và có thể lây nhiễm lên người qua con đường tiêu thụ thực phẩm. Vi khuẩn *C. perfringens* và *C. difficile* đã được phát hiện hiện diện trong các loài thực phẩm. Tuy nhiên cho đến nay chưa có báo cáo nào về thực trạng nhiễm vi khuẩn *C. perfringens* và *C. difficile* trong rau củ quả và sản phẩm thịt được tiêu thụ tại Hà Nội để cung cấp dữ liệu về thực trạng thực phẩm nhiễm vi khuẩn *C. perfringens* và *C. difficile* tại Hà Nội cũng như Việt Nam.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định sự lưu hành vi khuẩn *C. perfringens* và *C. difficile* mang gen *cpa*, *tcdA* trong thịt tươi và rau ăn lá.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

150 mẫu thịt (bò, lợn, gà) và 220 mẫu rau ăn lá (rau xà lách, rau cải, rau thơm và bắp cải) được thu thập tại các chợ trên địa bàn 3 quận nội thành Hà Nội, gồm Đống Đa, Hoàng Mai, Hà Đông trong năm 2022, từ 6h sáng đến 8h sáng. Các mẫu được bảo quản mẫu tại ở nhiệt độ 4 - 8°C, vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm và được phân tích trong ngày.

2.2. Hóa chất, chủng chuẩn

2.2.1. Hóa chất và dụng cụ

Nghiên cứu sử dụng các hóa chất chính sau: Đệm peptone (BD, Mỹ), Thạch TSC (Merck, Đức), Thạch Chromagar *C. difficile* (Chromagar, Pháp), BHI broth (Merck, Đức), Kháng sinh (D-cycloserin, cefoxitin, taurocholate - Sigma, Đức), Hỗn hợp dùng trong khuếch đại PCR master mix 2x (Thermo); Thang ADN kích thước từ 50 bp đến 1.000 bp (Thermo), Agarose điện di ADN (Thermo), Đệm tải mẫu 6x (Thermo), Thuốc nhuộm ADN (Intron), Đệm TAE 1X (Thermo), Đĩa petri vô trùng (Corning, Mỹ), Que cấy vô trùng (Biologix, Mỹ).

2.2.2. Chứng chuẩn

Nghiên cứu sử dụng chủng chuẩn *C. perfringens* ATCC 13214 cho quá trình định lượng *C. perfringens*, chủng *C. perfringens* phân lập từ mẫu ngộ độc có ký hiệu V.95 cho quá trình khuếch đại gen *cpa*, và chủng chủng *C. difficile* có nguồn gốc từ viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, có ký hiệu V.96 cho quá trình khuếch đại gen *tcdA*. Các chủng này đã được định danh bằng kỹ thuật ion hóa theo cơ chế giải hấp phụ sử dụng nguồn laser với sự trợ giúp của chất nền (MALDI TOF) và kỹ thuật giải trình tự gen xác định loài và xác định gen gây độc trước khi tiến hành thử nghiệm.

2.3. Thiết bị

Nghiên cứu sử dụng các thiết bị chính sau: Nồi hấp (Hymaraya, Nhật), Tủ âm (Memert, Đức), Tủ an toàn sinh học cấp 2 (Bio II, Anh), Máy đồng nhất mẫu (Anh), Máy PCR (Biorad), Máy điện di, Máy giải trình tự Sanger (Thermo).

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Định lượng vi khuẩn *C. perfringens*

Sử dụng phương pháp nuôi cấy vi sinh truyền thống theo TCVN 4991:2005 [3]: Cân 10 g mẫu trong 90 mL đệm peptone được huyền phù 10^{-1} , tạo các huyền phù pha loãng $10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$... Hút 1 mL dịch huyền phù cho vào đĩa petri, tiến hành tại các độ pha loãng liên tiếp. Đổ 15 mL thạch TSC (có kháng sinh D-cycloserin) vào đĩa. Để đông, ủ $37^{\circ}\text{C}/18 - 22\text{h}$. Đếm các khuẩn lạc điển hình màu đen, thử kháng định sinh hóa sử dụng môi trường nitrat để thử tính di động và môi trường lactose-gelatin. Các phép thử kháng định sinh hóa bao gồm: tính di động, chuyển hóa nitrat thành nitrit, lên men đường lactose, hóa lỏng gelatin. Tính di động và chuyển hóa nitrat thành nitrit: Cấy đâm sâu từng khuẩn lạc đã chọn sang môi trường nitrat để thử tính di động. Ủ trong các điều kiện kỵ khí ở 37°C trong 24 h. Kiểm tra ống môi trường nitrat để thử tính di động đối với loại mọc dọc theo đường cấy đâm sâu. Tính di động là bằng chứng phát triển lan rộng vào môi trường cách xa đường cấy đâm sâu. Kiểm tra sự có mặt của nitrit bằng cách bổ sung 0,2 - 0,5 mL thuốc thử phát hiện nitrit cho vào từng ống môi trường nitrat để thử tính di động. Cấy từng khuẩn lạc đã chọn vào môi trường lactose-gelatin vừa mới khử khí. Ủ trong các điều kiện kỵ khí ở 37°C trong 24 h. Kiểm tra các ống nghiệm đựng môi trường lactose-gelatin về việc sinh khí và có xuất hiện màu vàng (do hình thành acid) cho thấy sự lên men lactose. Làm lạnh các ống 1 h ở 5°C và kiểm tra sự hóa lỏng gelatin. Nếu môi trường đã đông đặc thì ủ lại thêm 24 h để kiểm tra lại sự hóa lỏng gelatin. Các vi khuẩn sinh ra các khuẩn lạc màu đen trong môi trường TSC mà không di động, thường khử nitrat thành nitrit, sinh acid và sinh khí từ lactose và hoá lỏng gelatin trong vòng 48 h được coi là *C. perfringens* và tính kết quả theo TCVN 6404:2016 [4].

2.4.2. Phát hiện *C. difficile*

25 g mỗi mẫu được đồng nhất trong 75 mL môi trường BHI (bổ sung 8 μ g cefoxitin/mL, 250 μ g cycloserine/mL và 0,1% taurocholate), trong 37°C/72h trong điều kiện kỵ khí. Dung dịch sau tăng sinh được cấy trên môi trường Chromagar agar *C. difficile*, các khuẩn lạc phát quang được xác định là *C. difficile* [5-7], khẳng định song song cùng kỹ thuật MALDI TOF [9].

2.4.3. Xác định vi khuẩn *C. perfringens* và *C. difficile* mang gen sinh độc tố

Xác định vi khuẩn *C. perfringens* mang gen *cpa* bằng kỹ thuật PCR dựa trên độ dài đoạn gen khuếch đại. Sử dụng cặp mồi đã được công bố bởi tác giả Mohiuddin và cộng sự vào năm 2020 [9]. Chạy phản ứng PCR với trình tự mồi *cpa*-F (5'-GCTAATGTTACTGCCGTTGA) và *cpa*-R (5'-CCTCTGATACATCGTGTAAG -3'), cho sản phẩm khuếch đại 324 bp. Chu trình phản ứng PCR: Biến tính DNA: 94°C/10 phút; 40 chu kỳ: Biến tính DNA 94°C/45s, gắn mồi 55°C/90s; kéo dài chuỗi 72°C/90s; và giai đoạn ổn định 72°C/10 phút. Điện di sản phẩm khuếch đại trên gel 2%.

2.4.4. Xác định vi khuẩn *C. difficile* mang gen *tcdA*

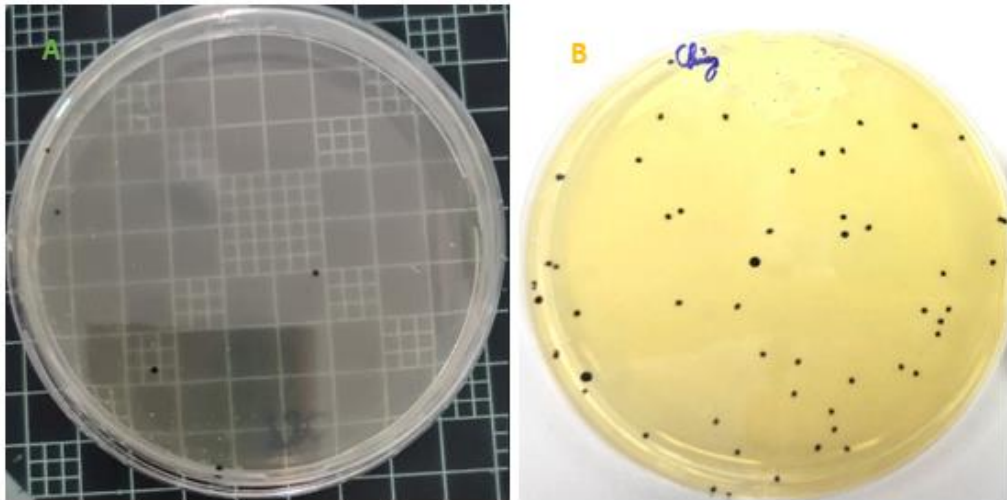
Xác định vi khuẩn *C. difficile* mang gen *tcdA* bằng kỹ thuật PCR dựa trên độ dài đoạn gen khuếch đại. Sử dụng cặp mồi đã được công bố bởi tác giả Lemee và cộng sự vào năm 2004 [10]. Chạy phản ứng PCR với trình tự mồi *tcdA*-F (5'-AGATTCCTATATTTACATGACAATAT) và *tcdA*-R (GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT), cho sản phẩm khuếch đại 369 bp. Chu trình phản ứng PCR: biến tính DNA: 95°C/3 phút; 40 chu kỳ: biến tính DNA 95°C/30s, gắn mồi 55°C/30s; kéo dài chuỗi 72°C/30s; và giai đoạn ổn định 72°C/10 phút. Điện di sản phẩm khuếch đại trên gel 2%.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Sự lưu hành Vi khuẩn *C. perfringens* mang gen *cpa* trong thịt tươi và rau ăn lá

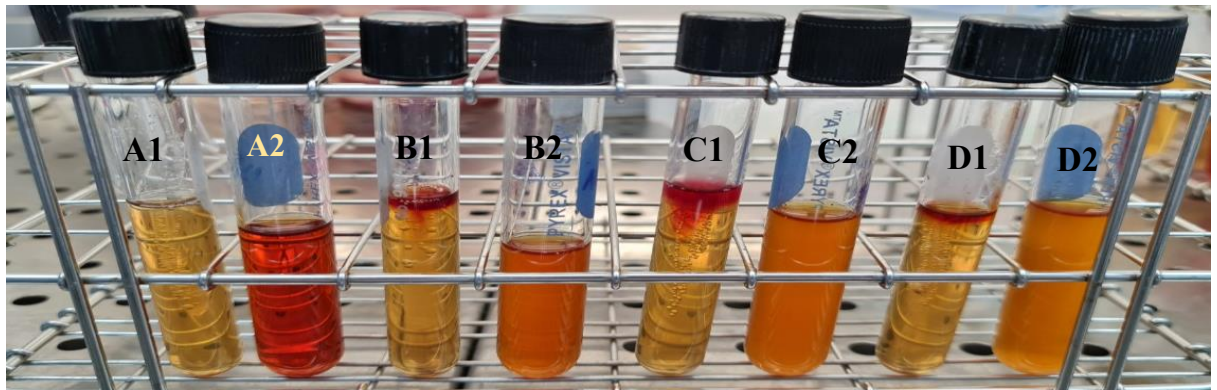
3.1.1. Sự lưu hành vi khuẩn *C. perfringens* trong thịt tươi và rau ăn lá

150 mẫu thịt tươi và 220 mẫu rau được bán tại các chợ thuộc 03 quận nội thành Hà Nội trong năm 2022 được tiến hành phân tích và định lượng *C. perfringens*. Các khuẩn lạc màu đen trên môi trường TSC (Hình 1) được tiến hành thử sinh hóa và khẳng định *C. perfringens* (Hình 2), cho thấy tỉ lệ mẫu nhiễm *C. perfringens* là 26,67 và 26,82% tương ứng ở mẫu thịt tươi và mẫu rau ăn lá.



Hình 1. Vi khuẩn *C. perfringens* trên thạch TSC

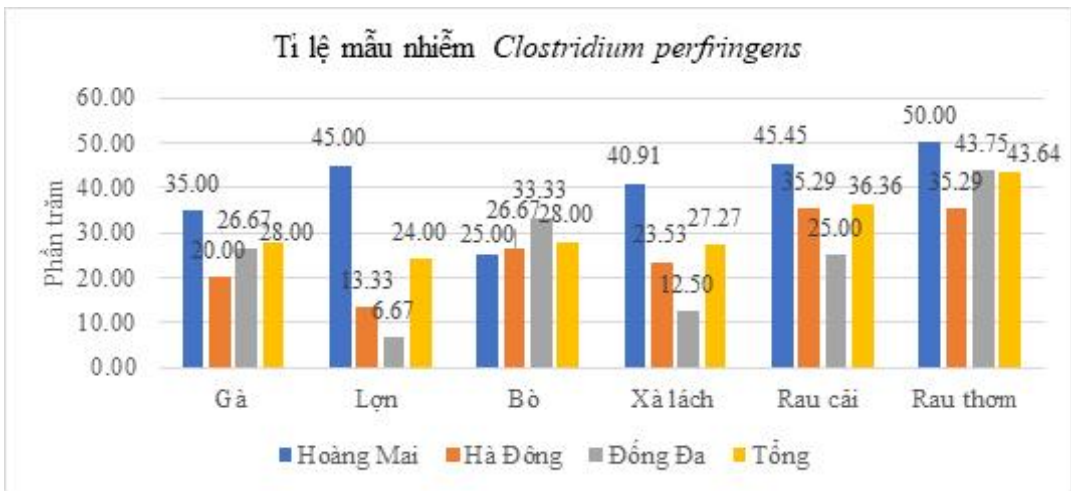
- A) Vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ mẫu thịt gà, tại nồng độ pha loãng 10^{-3} trên môi trường TSC
B) Vi khuẩn *C. perfringens* ATCC 13124



Hình 2. Kết quả thử Sinh hóa của vi khuẩn *C. perfringens*

- A) Đối chứng âm: A1, môi trường di động; A2: môi trường lactose-gelatin
B) B1: *C. perfringens* ATCC 13124; B2, *C. perfringens* ATCC 13124 lên men đường lactose chuyển môi trường sang màu vàng và hóa lỏng gelatin
C và D) Vi khuẩn *Clostridium perfringens* phân lập từ mẫu. C1, D1: di động và chuyển hóa Nitrat thành Nitrit tạo thành màu đỏ; C2, D2: lên men đường lactose chuyển môi trường sang màu vàng và hóa lỏng gelatin

Kết quả phân tích cho thấy tỉ lệ mẫu nhiễm *C. perfringens* trên thịt tươi là 75,56; 53,33 và 35,56% tương ứng tại Quận Đống Đa, Hoàng Mai, Hà Đông (Hình 3). Kết quả nghiên cứu cho thấy tỉ lệ thịt nhiễm *C. perfringens* tương đồng giữa các loại thịt gà, thịt bò và thịt lợn là từ 24 - 28%. Trong 4 loại rau đã được thu thập thì cho thấy rau thơm (rau mùi ta, rau mùi tàu, diếp cá, ngò, húng chó) cho tỉ lệ nhiễm *C. perfringens* là cao nhất với 43,64%, tiếp đến là rau cải với 36,36% và rau xà lách với 27,27% và không ghi nhận *C. perfringens* trong mẫu rau bắp cải (Hình 3).



Hình 3. Tỉ lệ mẫu nhiễm *C. perfringens* trên các nền mẫu thực phẩm

Kết quả nghiên cứu có sự tương đồng về sự hiện diện của vi khuẩn *C. perfringens* với các nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới trong thịt và sản phẩm thịt, tuy khác nhau về tỉ lệ nhiễm. Bước đầu kết quả nghiên cứu của chúng tôi về sự lưu hành của *C. perfringens* cho thấy ghi nhận được tỉ lệ cao hơn một số báo cáo đã thực hiện tại một số nước trên thế giới. Viện Môi trường và Y tế công cộng năm 2011 của Hà Lan công bố tỉ lệ mẫu nhiễm *C. perfringens* là 7% trong thịt và sản phẩm thịt (n = 167) và 14% trong rau thơm và gia vị (n = 2890) [11]. Trong một nghiên cứu khác được thực hiện bởi Hu và cộng sự và (2018) trên đối tượng thịt gà, bò, lợn, vịt (n = 232) cho thấy tỉ lệ dương tính là 12,9% [12]. Bendary và cộng sự trong nghiên cứu thực hiện tại Egyp trên các mẫu thu thập tại siêu thị công bố năm 2022 đã ghi nhận 12,6% thịt gà (n = 150) và 10% (n = 150) thịt bò nhiễm *C. perfringens* [13].

Mặt khác, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho tỉ lệ dương tính *C. perfringens* thấp hơn các nghiên cứu khác đã công bố trong thịt và sản phẩm thịt. Miki và cộng sự (2008) cho thấy tỉ lệ thịt tươi nhiễm *C. perfringens* là 71% (n = 200) tại Nhật Bản [14]. Nghiên cứu của Guran và cộng sự thực hiện năm 2011 tại Thổ Nhĩ Kỳ cho thấy sự hiện diện của *C. perfringens* cao trong thịt gà, với 66% ức gà (n = 50), 94% cánh gà (n = 50), 80% đùi gà và má đùi (n = 50), 66% đùi gà (n = 50) nhiễm *C. perfringens* [15]. Nghiên cứu của Chukwu và cộng sự tại Nigeria năm 2016 cho thấy *C. perfringens* hiện diện thường xuyên nhất trong các sản phẩm thực phẩm (29/50) ở Bang Lagos. Nhóm hàng thực phẩm gồm rau (56%) và các sản phẩm thịt (34%) nhiễm *C. perfringens* [16]. Một nghiên cứu khác trên thịt bò đã cắt thành miếng tại lò mổ được thực hiện bởi Jiang và cộng sự vào năm 2019 tại tỉnh Thiểm Tây Trung Quốc, cho thấy tỉ lệ nhiễm *C. perfringens* là 38,2% (n = 165) [17]. Trong một nghiên cứu khác được thực hiện bởi Issimov và cộng sự năm 2021 tại Miền Tây Kazakhstan cho thấy tỉ lệ dương tính của *C. perfringens* trên thịt là 50% (n = 40) và mật độ vi khuẩn được định lượng có giá trị trung bình là 2×10^4 CFU/g [18]. Sự ô nhiễm

C. perfringens trong sản phẩm thịt tươi có thể xảy ra trong quá trình giết mổ, vận chuyển và bảo quản.

Trên đối tượng thực phẩm khác là các loại rau (rau ăn lá và rau khô) cũng cho thấy sự hiện diện của *C. perfringens* như nghiên cứu của chúng tôi. Azimirad và cộng sự năm 2021 công bố tỉ lệ mẫu rau ăn lá nhiễm *C. perfringens* là 21,2% (n = 274) 2019 tại 21 quận của thủ đô Tehran, Iran [19]. Cũng trong một nghiên cứu khác được thực hiện tại Iran trên đối tượng là rau khô trong năm 2021, Ghourchian và cộng sự báo cáo 9,3% (n = 140) nhiễm *C. perfringens* [20]. Nghiên cứu của Hashimoto và cộng sự về sự hiện diện của *C. perfringens* trong đất bám trên bề mặt củ khoai tây thu thập từ 6 vùng của 14 tỉnh tại Nhật Bản, cho thấy 25/30 mẫu chứa *C. perfringens* [21]. Nghiên cứu này của Hashimoto và cộng sự cũng có thể được xem như là một minh chứng khoa học lý giải cho nguyên nhân các mẫu rau nhiễm vi khuẩn *C. perfringens*; Các loại rau có thể bị lây nhiễm vi khuẩn *C. perfringens* từ đất trồng.

Sự nhiễm các vi khuẩn *C. perfringens* trên rau ăn lá được xác định có thể do lây nhiễm trong quá trình trồng trọt bắt nguồn từ nguồn nước tưới và đất, và là nguyên nhân thường thấy tại các nước đang phát triển là rau có thể được rửa tại nguồn nước ô nhiễm trước khi phân phối ra thị trường. Trong sản xuất nông nghiệp, rau nhiễm các vi sinh vật gây bệnh có thể liên quan tới quá trình sử dụng nước ao và nước sông để rửa rau, cách thức xử lý rau của người trồng rau và lưu trữ rau ở những nơi bị ô nhiễm. Thông tin có sẵn về hàm lượng vi khuẩn trong nước rửa cũng như rau và sự ô nhiễm sản phẩm thực vật bởi mầm bệnh của con người là một thực tế đã biết. Sự lây truyền vi khuẩn từ đất và nguồn nước lên rau là con đường lý giải cho sự nhiễm khuẩn *C. perfringens* trong rau ăn lá thu thập trên địa bàn Hà Nội với tỉ lệ 26,82%.

Phép thử định lượng cho thấy số lượng vi khuẩn *C. perfringens* tính theo giá trị log dao động từ 2,70 - 4,48 CFU/g thịt gà, từ 2,30 - 4,26 CFU/g thịt lợn, từ 2,56 - 4,30 CFU/g thịt bò, từ 1,70 - 2,91 CFU/g xà lách, từ 1,90 - 2,81 CFU/g rau cải, từ 2,20 - 3,51 CFU/g rau thơm theo Bảng 1.

Bảng 1. Mật độ *C. perfringens* (log CFU) trong từng loại thực phẩm

Thực phẩm/mật độ <i>C. perfringens</i> (log CFU/g)	Gà	Lợn	Bò	Xà lách	Rau cải	Rau thơm
Nhỏ nhất	2,70	2,30	2,56	1,70	1,90	2,20
Lớn nhất	4,48	4,26	4,30	2,91	2,81	3,51

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về mật độ *C. perfringens* trong mẫu rau và mẫu thịt tương đồng với các nghiên cứu khác. Báo cáo được công bố năm 2017 bởi French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) [22] cho

thấy sự mật độ *C. perfringens* trong mẫu rau dao động từ 2,56 - 2,97 log CFU. Trong một nghiên cứu khác được thực hiện bởi Bendary và cộng sự cho thấy số lượng *C. perfringens* trong các mẫu thịt dương tính vượt quá 10^2 CFU/g với các giá trị trung bình là 4,08 và 2,09 log CFU trong các mẫu thịt gà và thịt bò được kiểm tra [13]. Issimov và cộng sự năm 2021 đã ghi nhận và mật độ vi khuẩn *C. perfringens* được định lượng có giá trị trung bình là 2×10^4 CFU/g tại Miền Tây Kazakhstan [18].

Kết quả nghiên cứu cho thấy *C. perfringens* có mặt trong thịt tươi và rau ăn lá lưu hành tại các chợ; Điều này có thể xảy ra do *C. perfringens* tồn tại trong đường tiêu hóa của con người và động vật, được bài tiết qua đường thải và lây nhiễm lên thịt tươi qua quá trình giết mổ. Cũng như rau ăn lá có thể lây nhiễm *C. perfringens* qua quá trình trồng trọt từ đất và nước tưới. Tuy nhiên do vi khuẩn *C. perfringens* có thể bị tiêu diệt khi đun nóng tại nhiệt độ 74°C và các bào tử sinh ra bởi *C. perfringens* có thể bị làm biến dạng khi xử lý tại nhiệt độ trên 80°C/30 phút [23], do đó các thực phẩm có nguồn gốc từ thịt và sản phẩm thịt, rau ăn lá (rau cải) khi được nấu chín đã có thể ngăn ngừa sự lây truyền của vi khuẩn từ thực phẩm lên người. Còn đối với các sản phẩm được tiêu thụ không qua chế biến sẵn như rau thơm, xà lách có mật độ *C. perfringens* tính theo log từ 1,70 - 2,91 CFU/g, mật độ này thấp hơn nhiều với nồng độ vi khuẩn được công bố là có khả năng gây ngộ độc thực phẩm trên người là 10^6 CFU/g thức ăn. Do đó, có thể thấy rằng *C. perfringens* lưu hành trên thịt tươi và rau ăn lá là 26% nhưng có thể chưa gây nguy hiểm cũng như ảnh hưởng tới người tiêu thụ các sản phẩm này. Điều này cũng trùng hợp với các báo cáo ngộ độc ghi nhận tại Việt Nam năm 2022, chưa ghi nhận vụ ngộ độc nào do *C. perfringens* gây ra.

3.1.2. Sự lưu hành của vi khuẩn *C. perfringens* mang gen *cpa* mã hóa protein độc tố alpha

Tất cả 109 khuẩn lạc *C. perfringens* sau khi định danh được tiến hành phản ứng PCR khuếch đại gen *cpa* mã hóa protein CPA. Kết quả khuếch đại gen chỉ cho thấy sự hiện diện của gen *cpa* mã hóa protein độc tố alpha trong 109 khuẩn lạc đã thu thập (Hình 4). Kết quả của nghiên cứu cho thấy 100% chủng *C. perfringens* mang gen *cpa* mã hóa độc tố alpha, tương đồng với các nghiên cứu đã được thực hiện bởi các nghiên cứu tại nhiều nước trên thế giới [24-25].

Năm 2020 tác giả Nguyễn Thị Thắm và cộng sự thực hiện nghiên cứu về sự hiện diện của *C. perfringens* mang gen sinh độc tố trên đường tiêu hoá của đà điểu tại Việt Nam vào năm 2020 cho thấy 116 chủng *C. perfringens* phân lập được từ 318 mẫu phân và 105 cơ quan tiêu hóa. Trong số 80 dòng phân lập từ mẫu phân, 33 dòng phân lập từ đà điểu khỏe mạnh và 47 dòng phân lập từ đà điểu bị bệnh. Kết quả multiplex PCR cho thấy tất cả 116 chủng *Clostridium perfringens* từ đà điểu khỏe mạnh và bị rối loạn đường ruột đều

mang gen mã hóa độc tố alpha (*cpa*) [26]. Điều này cho thấy sự hiện diện nguy cơ con người có thể tiếp xúc mầm bệnh *C. perfringens* mang gen sinh độc tố alpha.



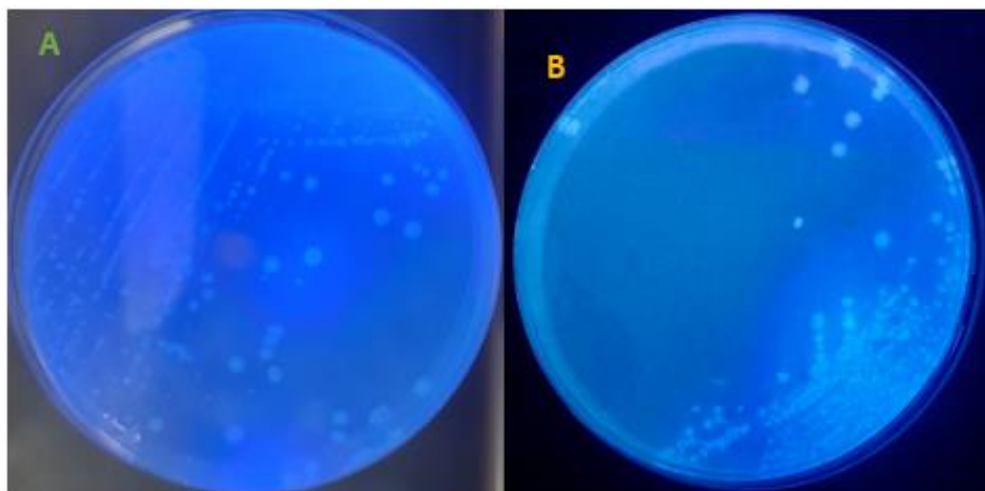
Hình 4. Đoạn khuếch đại gen *cpa* (324 bp) M: thang DNA 50 bp
 HM5, HM6, HM12, HM20: Mẫu thu thập tại quận Hoàng Mai
 B: Thành phần phản ứng PCR không bao gồm DNA vi khuẩn
 P: Chủng đối chứng *Clostridium perfringens*
 N: Chủng đối chứng âm *Clostridium difficile*

Sự hiện diện của gen *cpa* mã hóa độc tố alpha trong tất cả các chủng *C. perfringens* được phân lập từ người bệnh cho thấy rằng độc tố alpha đóng vai trò quan trọng trong việc gây nhiễm trùng các vi khuẩn này. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng độc tố alpha là yếu tố quyết định độc lực chính trong các trường hợp hoại tử khí và độc tố này có thể đóng một vai trò trong một số bệnh khác ở động vật và con người như bệnh Crohn ở người và viêm ruột hoại tử ở gia cầm. Độc tố alpha là nguyên nhân gây ra bệnh hoại tử cơ ở người khi vết thương hở của người bệnh tiếp xúc với lượng lớn *C. perfringens* mang độc tố. Do đó, kết quả nghiên cứu này cũng là một cảnh báo đối với các nhà nông cần tránh sự tiếp xúc giữa vết thương hở và các nguồn chứa vi khuẩn như đất, nước tưới, cây trồng, nước thải làm tăng nguy cơ bị hoại tử cơ và nhiễm trùng nghiêm trọng.

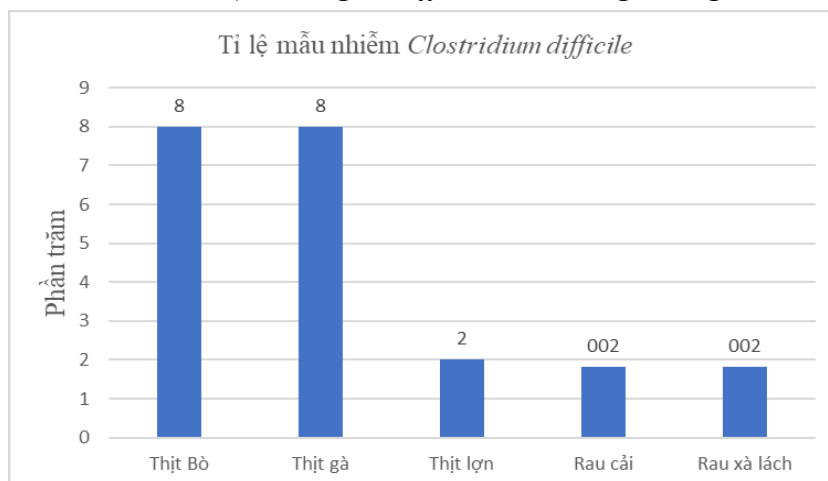
3.2. Sự lưu hành Vi khuẩn *C. difficile* mang gen *tcdA* sinh độc tố trong thịt tươi và rau ăn lá

3.2.1. Sự lưu hành vi khuẩn *C. difficile* trong thịt tươi và rau ăn lá

150 mẫu thịt tươi và 220 mẫu rau được bán tại các chợ thuộc 3 quận Nội Thành Hà Nội trong năm 2022 được tiến hành phân tích phát hiện *C. difficile*. Các khuẩn lạc phát quang trên môi trường thạch Chromagar *C. difficile* được khẳng định là *C. difficile* (Hình 5). Kết quả cho thấy tỉ lệ mẫu nhiễm *C. difficile* là rất thấp trên mẫu thịt tươi và mẫu rau ăn lá tương ứng là 6,00 và 0,9%. Vi khuẩn *C. difficile* được tìm thấy trong cả 3 loại thịt gà, lợn, bò và 2 loại rau ăn lá là rau cải và rau xà lách (Hình 6) và các khuẩn lạc phát quang phân lập từ các mẫu này đều cho kết quả tương đồng 99,9% với *C. difficile* bằng kỹ thuật MALDI TOF.



Hình 5. Vi khuẩn *C. difficile* trên thạch Chromagar *C. difficile*
A) Vi khuẩn *C. difficile* phân lập từ mẫu
B) Chủng *C. difficile* đối chứng dương



Hình 6. Tỷ lệ mẫu thực phẩm nhiễm *C. difficile*

Kết quả ghi nhận về tỷ lệ nhiễm *Clostridium* trong mẫu thịt và mẫu rau trong nghiên cứu này thấp hơn một số nghiên cứu khác trên thế giới. Theo báo cáo tổng hợp của Rodriguez và cộng sự năm 2016 cho thấy sự ô nhiễm *Clostridium* đã được phát hiện trong các loại sản phẩm thực phẩm khác nhau tại một số nước trên thế giới (châu Âu, Hoa Kỳ, Úc và châu Phi) bao gồm hải sản, rau và thịt, với tỷ lệ nhiễm từ 2.9 - 66.7% và bào tử của *Clostridium* cũng được tìm thấy trong các loại thịt từ 0 - 15% [27]. Rodriguez-Palacios và cộng sự (2009), ghi nhận sự hiện diện của vi khuẩn *Clostridium* từ thịt bò xay và sườn bò ở Canada, cho thấy việc nhiễm *Clostridium* trong thịt, và cũng đưa ra giả thuyết về mối liên hệ dịch tễ có thể xảy ra giữa sự phổ biến của *C. difficile* trên động vật sử dụng làm thực phẩm, một số loại thực phẩm và con người [28]. Cũng trong một nghiên cứu khác được thực hiện bởi Hawken và cộng sự năm 2013 trên đối tượng thịt lợn cũng cho thấy *Clostridium* được phát hiện trong tổng số 3 trong số 20 thân thịt (15%) sau khi giết mổ

[29]. Nghiên cứu được thực hiện bởi Bouttier và cộng sự từ năm 2007 - 2008 ghi nhận 1.9% mẫu thịt bò nhiễm *Clostridium* (n = 105) [30]. Nghiên cứu bởi Rodriguez-Palacios và cộng sự năm 2011 cho thấy không có mẫu thịt bò nào nhiễm *Clostridium* [31].

Rodriguez-Palacios và Lejeune (2013) báo cáo rằng nấu thức ăn ở nhiệt độ tối thiểu 96°C trong 15 phút tạo ra tác dụng ức chế bào tử *Clostridium* [31]. Tuy nhiên, trái cây và rau quả thường được chế biến dưới nhiệt độ này và do đó có thể là vật trung gian truyền bệnh tiềm ẩn cho con người. Nguồn ô nhiễm của những loại trái cây và rau quả có thể là do sử dụng phân hữu cơ có chứa bào tử *Clostridium*, hoặc tưới hoặc rửa bằng nước bị ô nhiễm [28]. Do đó với kết quả nghiên cứu cho thấy sự hiện diện của *Clostridium* trong mẫu rau cải và rau xà lách cho thấy cần phải có sự kiểm soát nghiêm ngặt nguồn nước tưới để làm giảm sự lây nhiễm *Clostridium* lên các loại rau ăn lá được tiêu thụ trực tiếp, qua đó làm giảm nguy cơ lây nhiễm lên người tiêu thụ.

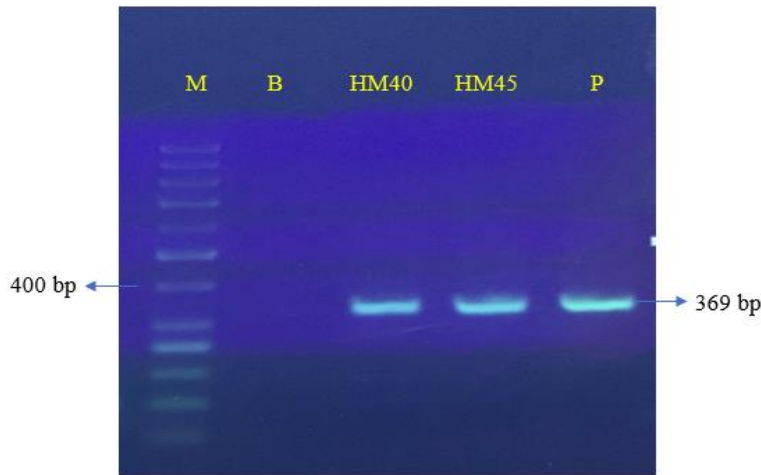
3.2.2. Sự lưu hành Vi khuẩn *C. difficile* mang gen *tcdA* mã hóa độc tố TcdA

Kết quả khuếch đại gen *tcdA* cho thấy 2 mẫu nhiễm vi khuẩn *C. difficile* mang gen *tcdA* (n = 11) chiếm 18,19%, trong đó sản phẩm khuếch đại đặc hiệu là 369 bp và xuất hiện sản phẩm phụ là 110 bp (Hình 7). Và chúng đối chứng dương thu được từ mẫu bệnh phẩm cũng cho thấy sự hiện diện của sản phẩm khuếch đại đặc hiệu và sản phẩm phụ. Cặp mồi khuếch đại gen *tcdA* cho phép nhân bản đoạn gen có kích thước 110 bp đối với các chủng *C. difficile* bị đột biến mất đoạn ADN trong trình tự lặp ở đầu 3' của gen *tcdA*. Đây có thể là sản phẩm tạo ra do sự bắt cặp không đặc hiệu của mồi xuôi hoặc mồi ngược với trình tự ADN lặp nằm trong đoạn gen *tcdA*.



Hình 7. Đoạn khuếch đại gen *tcdA* (369 bp) M: thang DNA 50 bp
 HM40, HM45: Mẫu thu thập tại quận Hoàng Mai
 Đ2, Đ3, Đ11, Đ13: Mẫu thu thập tại quận Đống Đa
 H3, H28, H30, H61, H70: Mẫu thu thập tại quận Hà Đông
 B: Thành phần phản ứng PCR không bao gồm DNA vi khuẩn
 N: Chủng đối chứng *Clostridium perfringens*
 P: Chủng đối chứng *Clostridium difficile*

Để khẳng định lại kết quả về việc 02 chủng vi khuẩn *C. difficile* đã phân lập là các chủng *C. difficile* bị đột biến mất đoạn ADN trong trình tự lặp ở đầu 3' của gen *tcdA* và khi khuếch đại bởi cặp mồi *tcdA* sẽ cho sản phẩm PCR là đoạn gen có kích thước 369 bp; chúng tôi tiến hành nhân dòng plasmid và thực hiện lại phản ứng khuếch đại gen. Kết quả cho thấy cả 2 chủng trên đều cho sản phẩm với đoạn gen đích có kích thước 369 bp (Hình 8).



Hình 8. Đoạn khuếch đại gen *tcdA* (369 bp) M: thang DNA 50 bp
HM40, HM45: Sản phẩm nhân bản gen từ sản phẩm khuếch đại gen *tcdA*
B: Thành phần phản ứng PCR không bao gồm DNA vi khuẩn
P: Chủng đối chứng *C. difficile*

Hai mẫu nhiễm *C. difficile* mang gen *tcdA* bao gồm 1 mẫu thịt gà (n = 150 mẫu thịt, n = 50 thịt gà) và 1 mẫu rau xà lách (n = 220 mẫu rau; n = 55 mẫu rau xà lách) được thu thập tại Quận Hoàng Mai. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỉ lệ thấp mẫu thịt và mẫu rau nhiễm *C. difficile* mang gen *tcdA*, chiếm 18,19% (n = 11).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tỉ lệ lưu hành thấp của các chủng *C. difficile* mang gen *tcdA* mã hóa protein độc tố trong thịt tươi và rau ăn lá, và không có chủng *C. difficile* nào mang gen *tcdB* mã hóa protein độc tố được ghi nhận trong nghiên cứu này. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu tại một số nước trên thế giới. Nghiên cứu của Rahimi và cộng sự năm 2014 báo cáo tỉ lệ thấp mẫu thịt nhiễm vi khuẩn *C. difficile* mang gen *tcdA* 1,67% (n = 660) [32]. Nghiên cứu của Muratoglu (2020) ghi nhận 2,67% mẫu thịt tươi nhiễm vi khuẩn *C. difficile* mang gen *tcdA* [33]. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn rất nhiều các báo cáo đã được công bố tại một số nước. Kheratman và cộng sự năm 2017 đã ghi nhận 26,6% mẫu thịt bò (n = 30) nhiễm vi khuẩn *C. difficile* mang gen *tcdA* [34].

Các bằng chứng khoa học chứng minh độc tố TcdA tạo ra tổn thương lan rộng tại niêm mạc cho phép TcdB tác động đến các tế bào biểu mô, và TcdB là yếu tố độc lực chính của *C. difficile*, các triệu chứng bệnh do *C. difficile* được tìm thấy tại các bệnh nhân bị nhiễm các chủng *C. difficile* mang độc tố *tcdB* và không sản sinh độc tố TcdA [31]. Từ

đó có thể thấy với tỉ lệ phát hiện 01 mẫu/ 150 mẫu thịt và 01 mẫu rau xà lách/ 220 mẫu rau chứa *C. perfringens* mang gen *tcdA* và không mang gen *tcdB*, thì chưa hiện diện nguy cơ về *C. difficile* gây bệnh truyền qua thực phẩm trên thịt và rau ăn lá tại các chợ truyền thống.

4. KẾT LUẬN

Tỉ lệ mẫu nhiễm thịt tươi và rau ăn lá nhiễm *C. perfringens* là 26,67% (n = 150) và 26,82% (n = 220). Mật độ vi khuẩn *C. perfringens* trên thịt tính theo giá trị log dao động từ 2,56 - 4,30 CFU/g. Mật độ vi khuẩn *C. perfringens* trên rau tính theo giá trị log dao động từ 1,70 - 3,51 CFU/g. Mẫu thực phẩm nhiễm *C. difficile* là rất thấp với 6,00% (n = 150) và 0,9% (n = 220) mẫu thịt tươi và mẫu rau ăn lá tương ứng. 100% chủng *C. perfringens* mang gen *cpa* mã hóa độc tố alpha. Hai mẫu thực phẩm (thịt gà, rau xà lách) nhiễm vi khuẩn *C. difficile* mang gen *tcdA* (n = 11) chiếm 18,19%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. World Bank, “Vietnam food safety risks management: challenges and opportunities,” Washington, D.C.: World Bank Group, 2017.
- [2]. General Statistics Office, “Statistical Yearbook,” 2019 (in Vietnamese).
Address: <https://www.gso.gov.vn/wp-content/uploads/2020/09/Nien-giam-thong-ke-day-du-2019.pdf>.
- [3]. Directorate for Standards, Metrology and Quality, “Vietnamese Standard TCVN 4991:2005 (ISO 7937:2004) on Microorganisms in food and animal feed - Quantitative method of *Clostridium perfringens* on agar plate - Counting technique colonies,” 2005 (in Vietnamese).
- [4]. Directorate for Standards, Metrology and Quality, “Vietnam Standard TCVN 6404:2016 (ISO 7218: 2013) Microbiology of Food and Feed - General Requirements and Guidelines for Microbiological Testing,” 2016 (in Vietnamese).
- [5]. E. Catherine, B. Burghoffer and F. Barbut, “Contamination of ready-to-eat raw vegetables with *Clostridium difficile* in France,” *Journal of Medical Microbiology*, vol. 62, pp. 1435-1438, 2013.
- [6]. E. Catherine, B. Burghoffer, and F. Barbut, “Evaluation of the Chromogenic Agar chromID *C. difficile*,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 51, no. 3, pp. 1002-1004, 2013.
- [7]. Perry J. D., “A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics,” *Clinical Microbiology Review*, 30, pp.449-479, 2017.

- [8]. Vitek MS, "Manual Instruction," 2017.
- [9]. M. Mudassar, Z. Iqbal, A. Siddique, S. Liao, M. K. Farooq Salamat, N. Qi, A. M. Din, and M. Sun, "Prevalence, Genotypic and Phenotypic Characterization and Antibiotic Resistance Profile of *Clostridium perfringens* Type A and D Isolated from Feces of Sheep (*Ovis aries*) and Goats (*Capra hircus*) in Punjab, Pakistan," *Toxins*, vol. 12, no. 657, 2020.
- [10]. L. Lemee, A. Dhalluin, S. Testelin, M-A. Mattrat, K. Maillard, J-F. Lemeland, and J-L. Pons, "Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*," *Journal of Clinical Microbiololgy*, vol. 42, no. 12, pp. 5710-5714, 2004.
- [11]. L. M. Wijnands, A. van der Mey - Florijn, E. D. - van Asch, "*Clostridium perfringens* associated food borne disease: Final report," *National Institute for Public Health and the Environment*, Ministry of Health, Welfare and Sport, the Netherland, 2011.
- [12]. H. Wen-Si, H. Kim, and O. K. Koo, "Molecular genotyping, biofilm formation and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolated from meat supplied to school cafeterias in South Korea," *Anaerobe*, 2018.
- [13]. M. Bendary Mahmoud, M. I. Abd El-Hamid, R. M. El-Tarabili, A. A. Hefny, R. M. Algendy, N. A. Elzohairy, M. M. Ghoneim, M. M. Al-Sanea, M. H. Nahari, and W. H. Moustafa, "*Clostridium perfringens* Associated with Foodborne Infections of Animal Origins: Insights into Prevalence, Antimicrobial Resistance, Toxin Genes Profiles, and Toxinotypes," *Biology*, vol. 11, no. 551, 2022.
- [14]. M. Yasuhiro, K. Miyamoto, I. Kaneko-Hirano, K. Fujiuchi, and S. Akimoto, "Prevalence and Characterization of Enterotoxin Gene-Carrying *Clostridium perfringens* Isolates from Retail Meat Products in Japan," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 17, pp. 5366-5372, 2008.
- [15]. H. S. Guran and G. Oksuztepe, "Detection and typing of *Clostridium perfringens* from retailchicken meat parts," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 57, pp. 77-82, 2013.
- [16]. E. C. Emelda, F. O. Nwaokorie, A. O. Coker, M. J. Avila-Campos, R. L. Solis, L. A. Llanco, and F. T. Ogunsola, "Detection of toxigenic *Clostridium perfringens* and *Clostridium botulinum* from food sold in Lagos, Nigeria," *Anaerobe*, vol. 42, pp. 176-181, 2016.
- [17]. J. Yanfen, Y. Ma, Q. Liu, T. Li, Y. Li, K. Guo, and Y. Zhang, "Tracing *Clostridium perfringens* strains from beef processing of slaughter house by pulsed-field gel electrophoresis, and the distribution and toxinotype of isolates in Shaanxi province, China," *Food Microbiology*, vol. 101, pp. 1-10, 2022.

- [18]. A. Issimov, T. Baibatyrrov, A. Tayeva, S. Kenenbay, S. Abzhanova, G. Shambulova, G. Kuzembayeva, M. Kozhakhieva, I. Brel-Kisseleva, O. Safronova, B. Lyailya, Y. Gulzhan, B. Kainar, K. Alma, and F. A. Uzal, "Prevalence of *Clostridium perfringens* and Detection of its Toxins in Meat Products in Selected Areas of West Kazakhstan," *Agriculture*, vol. 12, no. 1357, pp. 1-6, 2022.
- [19]. A. Masoumeh, B. Nadalian, H. Alavifard, S. N. Panirani, S. M. Vand Bonab, F. Azimirad, F. Gholami, P. Jabbari, A. Yadegar, L. Busani, H. A. Aghdaei, M. R. Zali, "Microbiological survey and occurrence of bacterial foodborne pathogens in raw and ready-to-eat green leafy vegetables marketed in Tehran, Iran," *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 237, no. 113824, pp. 1-9, 2021.
- [20]. S. Ghorchian, M. Douraghi, A. Rahimiforoushani, M. M. Soltan Dallal, "Isolation and identification of *cpe*-positive *Clostridium perfringens* in bulk and packed dehydrated vegetables," *Razi Journal of Medical Science*, vol. 26, no. 8, pp. 23-30, 2021.
- [21]. H. Atsushi, H. Suzuki, and K. Oonaka, "Prevalence of *cpe*-positive *Clostridium perfringens* in surface-attached soil of commercially available potatoes and its significance as a potential source of food poisoning," *Anaerobe*, vol. 79, no. 102687, 2023.
- [22]. A. A. Mahamat, "Characterization of *Clostridium perfringens* strains for the investigation of food poisoning outbreaks in France," *Foodborn Pathogens and Whole Genome Sequencing Joint Conference*, 26-28 March, 2019.
- [23]. L. Tingting, H. Bian, Z. Sun, X. Wang, F. Liu, and D. Wang, "Inactivation of *clostridium perfringens* C1 spores by the combination of mild heat and lactic acid," *Foods*, vol. 11, no. 23, 2022.
- [24]. K. T. Onur, T. Uyanik, S. Kanat, Ö. Çadirci, and A. Gücükoğlu, "Detection of *Clostridium perfringens* and determination of enterotoxin genes (*cpa* and *cpe*) in traditional turkish chicken doner kebab," *Ankara Univ Vet Fak Derg*, no. 69, pp. 117-122, 2020.
- [25]. L. Yuan-Tong and R. Labbe, "Enterotoxigenicity and Genetic Relatedness of *Clostridium perfringens* Isolates from Retail Foods in the United States," *Applied And Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 3, pp. 1642-1646, 2003.
- [26]. Tham Thi Nguyen, Hung Vu-Khac and Tan Duc Nguyen, "Isolation and characterization of *Clostridium perfringens* strains isolated from ostriches (*Struthio camelus*) in Vietnam," *Veterinary World*, vol. 13, no. 8, pp. 1679-1684, 2020.
- [27]. C. Rodriguez, B. Taminiau, J. Van Broeck, M. Delme'e, and G. Daube, "*Clostridium difficile* in Food and Animals: A Comprehensive Review," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016.

- [28]. A. Rodriguez-Palacios, C. Pickworth, S. Loerch, and JT. LeJeune, “Transient fecal shedding and limited animal-to-animal transmission of *Clostridium difficile* by naturally infected finishing feedlot cattle,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, pp. 3391-3397, 2011.
- [29]. P. Hawken, J. S. Weese, R. Friendship, and K. Warriner, “Carriage and dissemination of *Clostridium difficile* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pork processing,” *Food Control*, no. 31, pp. 433-437, 2013.
- [30]. S. Bouttier, M-C. Barc, B. Felix, S.Lambert, A. Collignon, and F. Barbut, “*Clostridium difficile* in Ground Meat, France,” *Emerging Infectious Diseases*, vol. 16, no. 4, 2010.
- [31]. A. Rodriguez-Palacios, S. Borgmann, T. R. Kline, “*Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure,” *Animal Health Research Reviews*, vol. 14, pp. 11-29, 2013.
- [32]. R. Ebrahim, M. Jalali, and J. S. Weese, “Prevalence of *Clostridium difficile* in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran,” *BMC Public Health* 14, 2014.
- [33]. K. Muratoglu, E. Akkaya¹, H. Hampikyan, E. Baris Bingol, O. Cetin, and H. Colak, “Detection, Characterization and Antibiotic Susceptibility of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in Meat Products,” *Food Science and Animal. Resources*, vol. 40, no. 4, pp.578-587, 2020.
- [34]. K. Malihe, S. Jalilian, A. Alvandi, and R. Abiri, “Prevalence of *Clostridium difficile* and its toxigenic genotype in beef samples in west of Iran,” *IJM Iranian Journal of Microbiology*, vol. 9, no. 3, pp. 169-173, 2017.
- [35]. S. Di Bella, P. Ascenzi, S. Siarakas, N. Petrosillo, and A. di Masi, “*Clostridium difficile* Toxins A and B: Insights into Pathogenic Properties and Extraintestinal Effects,” *Toxins*, vol. 8, no. 134, 2016.

Prevalence of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* carrying *cpa*, *tcdA* toxin genes in raw meat and leafy vegetables

Tạ Thị Yến, Ninh Thị Hạnh, Vũ Thị Hải Hà, Phạm Văn Quan, Nguyễn Thành Trung

National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

Abstract

The genus *Clostridium* is a Gram-positive, spore-forming bacterium. Most species of *Clostridium* spp. usually are found in soil, water, dead plants, animal carcasses, and play an important role in the decomposition of substances in nature. Raw meat and fresh vegetable are more likely to be contaminated with spores or vegetative cells of the genus *Clostridium*. The study results showed that the percentage of samples contaminated with raw meat and leafy vegetables collected at markets in Dong Da, Ha Dong and Hoang Mai districts infected with *C. perfringens* was 26.67% (n = 150) and 26.82% (n = 220). The percentage of raw meat and leafy vegetable samples contaminated with *C. difficile* was very low with 6.00% (n = 150) and 0.9% (n = 220), respectively. Gene amplification reactions revealed the presence of *cpa* toxin gene in all *C. perfringens* strains and detected 02 *C. difficile* strains carrying the *tcdA* gene.

Keywords: *C. perfringens* and *C. difficile*, *cpa* gene, *tcdA* gene.