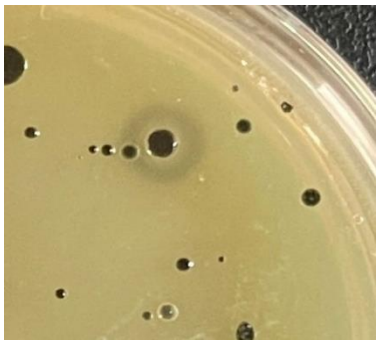
Chương 1. TỔNG QUAN VỀ NGHIÊN CỨU

1.1. GIỚI THIỆU VỀ *Staphylococcus aureus*

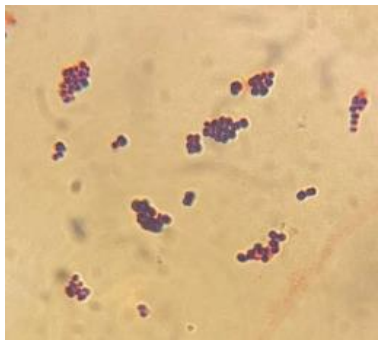
1.1.1. Hình thái và đặc điểm sinh hóa

Tên gọi *Staphylococcus aureus* được kết hợp giữa từ "Staphyle" và "cocci" theo tiếng Hy Lạp có nghĩa là chùm nho và "aureus" theo tiếng Latinh có nghĩa là vàng bởi khuẩn lạc phát triển có màu vàng. Tụ cầu khuẩn là những cầu khuẩn Gram dương có đường kính từ 0,8 – 1,0 µm và xếp lại với nhau thành hình chùm nho, có phản ứng coagulase – ngưng tụ huyết thanh và catalase – xúc tác phân giải H_2O_2 dương tính, không có lông, không có vỏ, không sinh nha bào (**Hình 1.2.**). *Staphylococcus aureus* có mặt ở khắp nơi trong môi trường và có thể được tìm thấy trong không khí, bụi, nước thải, nước, bề mặt môi trường, kể cả trên người và động vật (Hennekinne et al., 2012).

Trên môi trường Baird Parker (BP) khuẩn lạc *S. aureus* có màu đen bóng, lồi với đường kính 1 – 1,5 mm, hình thành hai vòng trong và đục rộng 2 – 5 mm xung quanh khuẩn lạc do có khả năng khử potassium tellurite và khả năng thuỷ phân lòng đỏ trứng của lethinase (**Hình 1.1.**) (Sandel & McKillip, 2004).



Hình 1.2. *S. aureus* trên môi trường Baird Parker



Hình 1.1. *S. aureus* dưới kính hiển vi

1.1.2. Điều kiện phát triển và môi trường

S. aureu phát triển ở nhiều môi trường khác nhau trong nhiệt độ từ 7 – 48°C, với nhiệt độ thuận lợi là 30 – 45°C và khoảng pH từ 4,2 – 9,3 với độ pH thuận lợi là 7 – 7,5 và trong môi trường chứa trên 15% NaCl. *S. aureus* dễ phát tán ra môi trường xung quanh và làm tăng khả năng nhiễm vào thực phẩm (Nguyễn, 2013).

1.1.3. Phân bố

S. aureus có khả năng bám dính tốt trên nhiều loại tế bào và máy móc, thiết bị, chúng được tìm thấy gần như mọi nơi trong tự nhiên, trong thực phẩm và nước uống. Vì thế, *S. aureus* phân bố rộng rãi, được tìm thấy nhiều nhất ở da, màng nhầy, tóc và mũi của người và động vật máu nóng (Nguyễn, 2013).

1.1.4. Khả năng gây bệnh

S. aureus là vi khuẩn cơ hội hiện diện trong hệ sinh thái của người và động vật. Thông thường chúng không gây nguy hiểm, nhưng có thể gây bệnh khi vượt qua hàng rào bảo vệ của da, qua lớp màng nhầy hoặc đi vào hệ tiêu hóa. Khi có cơ hội, chúng phát triển trên lớp da bị tổn thương, đau tai, nhổ răng hoặc ăn phải đồ ăn thức uống nhiễm khuẩn *S. aureus* gây vết thương mưng mủ và hoại tử mô, có thể đưa đến vết thương ở tĩnh mạch và đặc biệt là những khối huyết nhiễm khuẩn (GS. TS Nguyễn Văn Thanh, TS. Huỳnh Thị Ngọc Lan, PGS. TS. Trần Thị Hoa, 2011).

+ Vết thương trên da, dưới da, niêm mạc:

❖ Gây mụn nhọt

S. aureus gây một bệnh trên da gọi là hội chứng "bỏng da" hay bệnh Ritter, thường gặp ở trẻ sơ sinh với tiên lượng xấu. Nguyên nhân là do các chủng tụ cầu tiết ra độc tố Exfoliatine. Triệu chứng ban đầu gồm sốt và đỏ da, sau đó người bệnh xuất hiện các dấu hiệu bong lớp biểu bì đồng thời hình thành bọng nước trên diện rộng. Từ ổ nhiễm khuẩn đó nếu vi khuẩn vào máu có thể gây nhiễm khuẩn huyết.

❖ Hội chứng sốc do độc tố

Hội chứng sốc do *S. aureus* sản sinh độc tố gây nên tình trạng sốt nhanh, nôn mửa và tiêu chảy sau đó đau họng, đau cơ và phát ban rồi bong tróc da nhất là trong lòng bàn tay và bàn chân. Huyết áp tăng đột ngột dẫn đến sốt và trụy tim, tỉ lệ tử vong khá cao (GS. TS Nguyễn Văn Thanh, TS. Huỳnh Thị Ngọc Lan, PGS. TS. Trần Thị Hoa, 2011).

❖ Hội chứng Thukydides

Là thể đặc biệt của hội chứng sốc do nhiễm độc. Hội chứng này thường xảy ra sau khi bị cúm do bội nhiễm tụ cầu ở cả nam và nữ. Tỉ lệ tử vong rất cao (trên 50%).

+ Viêm tai – mũi – họng: viêm amidan, viêm xoang.

+ Nhiễm khuẩn huyết

S. aureus là nguyên nhân phổ biến nhất gây nhiễm khuẩn huyết. Tụ cầu vàng vào máu, theo đường máu đi tới các cơ quan khác (gan, phổi, não, tủy, xương), nếu đến tim gây nhiễm trùng tim và van tim (viêm cơ tim), có thể gây sốc, suy đa phủ tạng dẫn đến tử vong.

+ Ngộ độc thức ăn

Xảy ra do tiêu thụ thức ăn hoặc nước uống chứa enterotoxin do tụ cầu vàng tiết ra. Người bệnh bị nôn mửa dữ dội và có thể bị sốt, 2 – 8 giờ sau khi ăn bị tiêu chảy nặng, ói mửa, càng về sau phân và chất nôn chủ yếu là nước, 24 – 48 giờ sau thì hết. Tuy nhiên, nếu người bệnh mất nước và chất điện giải quá nhiều, không bổ sung kịp thời có thể dẫn đến sốc trụy tim mạch. *S. aureus* thường xuyên được tìm thấy trong những thực phẩm như: thịt, trứng, các loại salad, các loại bánh ngọt, bánh kem, sản phẩm từ sữa và ngay cả trong nước uống… vì các loại thực phẩm này thường được bảo quản ở nhiệt độ phòng, là điều kiện lý tưởng cho tụ cầu vàng phát triển.

+ Viêm ruột cấp tính

Do dùng kháng sinh có phổ rộng và ít hấp thu trong đường ruột một thời gian dài, kháng sinh diệt những vi khuẩn nhạy cảm để lại *S. aureus* đề kháng tăng sinh về số lượng gây ngộ độc.

+ Khả năng đề kháng

1.1.4.1. Khả năng chống chịu với môi trường khắc nghiệt

Mặc dù *S. aureus* là vi khuẩn không sinh bào tử, nhưng chúng có khả năng chống chịu với môi trường khắc nghiệt cao. Vi khuẩn có khả năng đề kháng với nhiệt độ, có thể chịu được nhiệt độ 60°C trong 30 phút, không chịu được tác động của vài loại phẩm màu nhuộm vi khuẩn như tím gentian, đề kháng tốt hơn những vi khuẩn khác với những chất tẩy trùng như phenol, clorua thủy ngân, chịu được tác động của áp suất thẩm thấu. Chúng sản xuất enzyme catalase là một đặc điểm để phân biệt với *Streptococci* (GS. TS Nguyễn Văn Thanh, TS. Huỳnh Thị Ngọc Lan, PGS. TS. Trần Thị Hoa, 2011).

1.1.4.2. Khả năng đề kháng kháng sinh

Một trong những kháng sinh phổ biến nhất trong điều trị *S. aureus* là kháng sinh họ beta- lactams mà điển hình là *penicillin*, mà sau này là *methicillin* (*penicillin* nhóm M). Tuy nhiên, chỉ 2 năm sau sử dụng *Methicillin* (1959), người ta đã phát hiện các các chủng *S. aureus* kháng *methicillin* (Methicillin-resistant *S. aureus* - MRSA). Hiện nay, chúng ta còn phát hiện được cả chủng *S. aureus* bắt đầu kháng lại *Vancomycin* (VRSA: *vancomycin* - resistant *S. aureus*) (GS. TS Nguyễn Văn Thanh, TS. Huỳnh Thị Ngọc Lan, PGS. TS. Trần Thị Hoa, 2011), (Vũ, 2020).

1.1.5. Kháng nguyên

+ Polysaccharid A và B:

Là hai kháng nguyên của tế bào giúp phân biệt *Staphylococcus aureus* và *Staphylococcus albus* bằng phản ứng miễn dịch học. *Polysaccharid A* được sản xuất bởi *S. aureus* còn *polysaccharid B* được sản xuất bởi *S. albus* (không gây bệnh).

+ Acid teichoic: có tính kháng nguyên.

+ Kháng nguyên của nang

Chỉ có ở một số loại *S. aureus* sản xuất *mucoid*, kháng nguyên chứa khoảng 70% carbohydrat (trong đó khoảng 1/3 là *glucosamin*), nó có thể chống lại sự thực bảo (GS. TS Nguyễn Văn Thanh, TS. Huỳnh Thị Ngọc Lan, PGS. TS. Trần Thị Hoa, 2011).

1.1.6. Độc tố và enzyme

Vi khuẩn tăng trưởng nhanh và rộng rãi trong các tế bào sống, tiết ra nhiều độc tố và enzyme gây bệnh. Hầu hết các dòng *S. aureus* có thể tổng hợp enterotoxin – độc tố ruột – là nguyên nhân chính gây ngộ độc thực phẩm.

- *Catalase*: bất hoạt hydrogen peroxide và các gốc tự do hình thành do hệ thống myeloperoxidase trong tế bào chủ (Nguyễn, 2013).

- *Hemolysin*: có ở những chủng vi khuẩn gây bệnh. Vết thương bị lở do tác dụng của loại độc tố này, gồm bốn loại (alpha, beta, gamma, delta), mang bản chất protein gây tan máu beta, tác động khác nhau lên hồng cầu.

Beta-hemolysis (β – toxin)

Hầu hết các chủng *S. aureus* sản xuất β – toxin, một loại protein phân hủy màng giàu lipid, gây thoái hóa sphingomyelin.

- *Leucocidin*: diệt bạch cầu đa nhân, *leucocidin* cũng làm tan máu nhưng yếu hơn *alpha-hemolysin*. Có gần 90% các dòng phân lập từ vết xước trên da tạo ra *leucocidin* nhưng chỉ có 2% trong tất cả các dòng *S. aureus* tiết ra độc tố này (Nguyễn, 2013).

- *Exfoliatin*: là ngoại độc tố gây tróc mảng da, có tính hướng da, tạo những vết bỏng ngoài da. Bệnh thường xảy ra ở trẻ em. *Exfoliatin* có hai loại: loại A và loại B, loại A có nguồn gốc từ nhiễm sắc thể trong khi loại B được sản xuất từ plasmid (GS. TS Nguyễn Văn Thanh, TS. Huỳnh Thị Ngọc Lan, PGS. TS. Trần Thị Hoa, 2011).

- *Enterotoxin*: một protein bền với nhiệt, không bị phân hủy ở 100°C trong vòng 30 – 70 phút Vì thế, mặc dù đồ ăn thức uống được nấu chín nhưng chúng ta vẫn có khả năng bị ngộ độc thực phẩm do *enterotoxin* chỉ cần (20 ng đến 1 μg) trên 1 g thực phẩm cũng đủ gây ngộ độc thực phẩm. Đây là loại độc tố ruột gây ngộ độc thức ăn hay viêm ruột cấp tính, tổng hợp bởi đa số các dòng *S. aureus*, được phân loại thành 18 mẫu huyết thanh từ A đến U dựa trên các đặc tính sinh học và được kí hiệu theo thứ tự: SEA, SEB, SEC, SED,…, SEU (BENNETT et al., 1986). Các độc tố này đi từ đường tiêu hóa vào dòng máu đến kích thích trung tâm nôn ở hành não gây buồn nôn, nôn mửa, sau đó đau quặn bụng và tiêu chảy vài ngày rồi hết (Greenfield et al., 2002).

- *Coagulase*: là enzyme quan trọng nhất tiết ra bởi các tụ cầu gây bệnh, làm đông đặc fibrin, các tụ cầu không gây bệnh thì không có khả năng tiết enzyme này. Coagulase sẽ gắn với *prothrombin* trong tế bào chủ hình thành phức hợp *staphylothrombin*, tạo ra một vách che chở vi khuẩn nằm giữa, dùng *chymotrypsin* và *tetracyclin* thủy giải chất này. Đa số bằng chứng cho thấy rằng đây không phải là yếu tố gây độc, mặc dù chúng có cơ chế gây đông để tránh bị thực bào và đáp ứng miễn dịch (Kenneth Todar, 2005).

1.1.7. Tổng hợp ca nhiễm

Theo dữ liệu từ trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa Dịch bệnh (CDC) công bố hơn 119.000 ca nhiễm *S. aureus* trong máu và hơn 20,000 ca tử vong tại Hoa Kì năm 2017(*Deadly Staph Infections Still Threaten the U.S.*, 2017). 171.200 ca nhiễm hàng năm tại các quốc gia thuộc Liên minh Châu Âu (EU), và ở Iceland và Na Uy có tới 5.400

trường hợp trên (R Kock, K Becker, B Cookson, J E van Gemert-Pijnen, S Harbarth, J Kluytmans, M Mielke, G Peters, R L Skov, M J Struelens, E Tacconelli, W Witte, 2014).

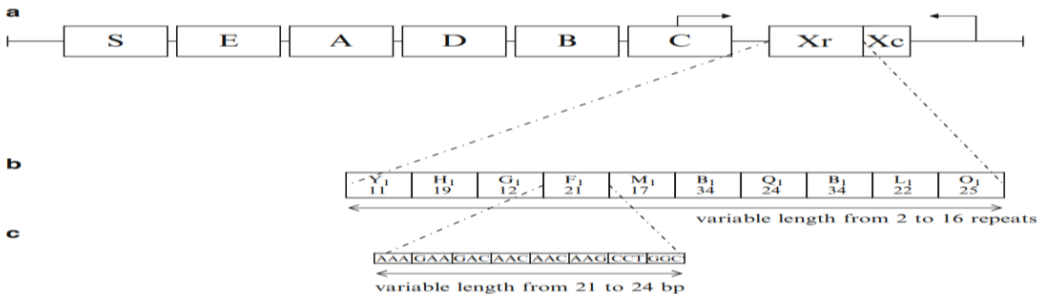
Ở Việt Nam, theo một số nghiên cứu trên cộng đồng thì thấy rằng trong 16 vi khuẩn gây bệnh thường gặp thì tỷ lệ nhiễm *S. aureus* lên tới 18,5 – 21,7% (Vũ, 2020).

1.2. GIỚI THIỆU VỀ GEN *SPA CỦA Staphylococcus aureus*

1.2.1. Cấu trúc

Gen *spa* là gene đặc trưng cho việc nhận diện *S. aureus* ở cấp độ phân tự. Gen có trình tự nucleotide mã hóa cho sự cấu thành protein A, có kính thước gen khoảng (1350–1400) bp (**Hình 1.3.)** (Shakeri et al., 2010).

Cấu trúc gen *spa* mã hóa cho gồm vùng tín hiệu peptidase (S), vùng liên kết immunoglobulin (IgG) gồm 5 miền liên kết (E, A, D, B, C) , vùng X đa hình gồm vùng lặp trình tự ngắn (Xr) và vùng bảo toàn (Xc). Vùng Xr sẽ thay đổi kích thước sau (2 – 16) lần lặp và trình tự DNA gen thay đổi từ (21 – 24) bp, dựa vào sự biến đổi trình tự vùng Xr để phân loại các kiểu gen *spa* (Hallin et al., 2009).



Hình 1.3. Sơ đồ cấu trúc gen *spa* của *S. aureus*

a) Cấu trúc gen, b) Cấu trúc lặp lại của vùng Xr, c) Trình tự lặp lại nucleotide

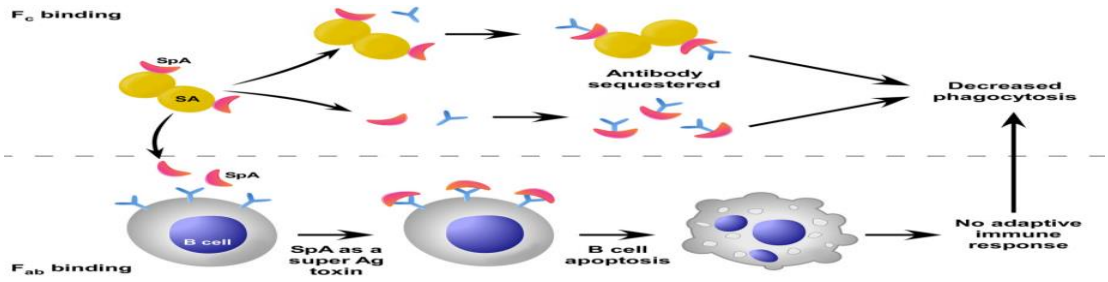
Protein A là protein bề mặt tế bào (40 – 60) kDa được tìm thấy trên thành tế bào của hầu hết các chủng vi khuẩn *S. aureus*. Protein này là một phần không thể thiếu trong quá trình tiến hóa của *S. aureus*, vì nó có thể đơn giản hóa quá trình lây truyền của vi khuẩn và cho phép vi khuẩn lây nhiễm vật chủ trong một khoảng thời gian ngắn hơn.

1.2.2. Chức năng

Chức năng chính của Protein A trong thành tế bào của vi khuẩn *S. aureus* liên quan đến độc lực (yếu tố xác định mức độ của mầm bệnh có thể gây bệnh cho vật chủ), đóng

vai trò ngăn chặn các phản ứng của tế bào bạch cầu lympho B từ vật chủ. Từ đó, đóng vai trò ngăn chặn sự phát triển khả năng miễn dịch ở vật chủ bị nhiễm bệnh.

Protein A cũng liên kết với 'vùng Fc' của IgG và cả 'vùng Fab' của tế bào bạch cầu lympho B trong vật chủ và kích hoạt các quá trình ngăn chặn quá trình thực bào opsonophagocytic và tiêu diệt các tế bào bạch cầu lympho B mà nó tiếp xúc (**Hình 1.4.**) (Kobayashi & DeLeo, 2013).



Hình 1.4. Chức năng gen *spa* của vi khuẩn *S. aureus*

1.2.3. Phát hiện *S. aureus* dựa trên gen *spa*

Theo như nghiên cứu của F. Shakeri và cộng sự về tính đa dạng của gen *spa* trong các chủng *S. aureus* kháng methicillin (MRSA) và nhạy cảm với methicillin (MSSA) cho thấy kết quả dự trên 208 chủng *S. aureus* phân lập gồm 59 chủng MRSA và 149 chủng MSSA thì chỉ có 8 chủng *S. aureus* là không có dải gen *spa* chiếm 3,8% so với số chủng còn lại mang gen *spa* chiếm tới 96,2% với tỷ lệ MRSA (96,6%) và MSSA (96%) (Shakeri et al., 2010).

Theo kết quả nghiên cứu của T. Bhati và cộng sự về các biến thể gen *spa* ở 38 chủng *S. aureus* được phân lập từ các trường hợp bò bị bệnh viêm vú thông qua khuếch đại gen *spa* bằng phản ứng PCR thì có tới 37 chủng *S. aureus* khuếch đại được gen *spa*, chứng tỏ các chủng trên đều mang gen *spa* (Bhati et al., 2016).

1.3. PHƯƠNG PHÁP KHUẾCH ĐẠI ĐẲNG NHIỆT VÒNG XOẮN POLYMERASE SPIRAL REACTION (PSR)

1.3.1. Tổng quan về phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt phát hiện *S. aureus* trong thực phẩm

Kỹ thuật khuếch đại DNA đẳng nhiệt đã được nghiên cứu và báo cáo bao gồm hệ thống khuếch đại dựa trên phiên mã (Transcription-based amplification system – TAS)

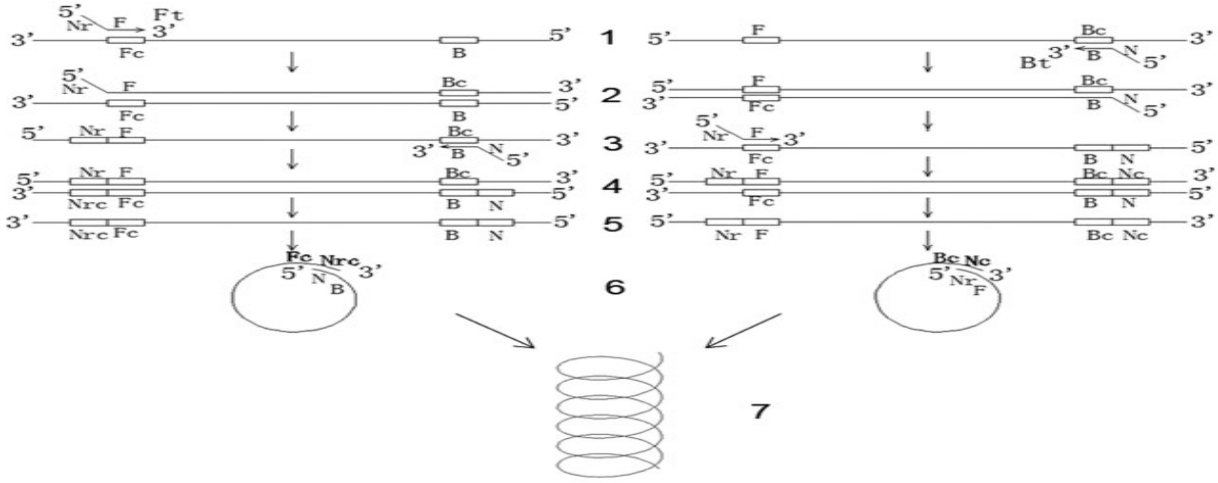
(Kwoh et al., 1989), phản ứng duy trì sao chép trình tự (Self-sustained sequence replication – 3SR) (Fahy et al., 1991), khuếch đại dịch chuyển sợi (Strand displacement amplification – SDA) (Walker et al., 1992), sao chép vòng lăn (Rolling circle replication – RCR) (Gusev et al., 2001), khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng (Loop-mediated isothermal amplification – LAMP) (Notomi et al., 2000), khuếch đại đẳng nhiệt đơn (Single primer isothermal amplification – SPIA) (Myrmel et al., 2017), khuếch đại mồi chéo (Cross priming amplification – CPA) (Kumar et al., 2018). Trong các phương pháp này, TAS, 3SR, NASBA, SDA, HDA và SPIA yêu cầu nhiều enzyme (ba hoặc nhiều hơn) và cần tối ưu hóa nghiêm ngặt. Chỉ một vài trong số các phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt như RCR, LAMP và CPA có thể thực hiện hiệu quả ở nhiệt độ không đổi mà chỉ sử dụng một enzyme. Tuy nhiên, phương pháp RCR chỉ có thể khuếch đại DNA vòng còn phản ứng LAMP và CPA cần tới bốn hoặc nhiều mồi để bắt đầu phản ứng.

Một số nghiên cứu gần đây với nhiệm vụ tìm ra một phương pháp đơn giản hóa quá trình phát hiện và chi phí thấp đã công bố về phản ứng khuếch đại đẳng nhiệt vòng xoắn (Polymerase Spiral Reaction – PSR) bởi Liu và cộng sự vào năm 2015 (Liu et al., 2015). thừa hưởng các ưu điểm vượt trội của LAMP và CPA về độ nhạy, độ đặc hiệu. Hơn nữa, PSR có thể hoạt động chỉ cần một cặp mồi và một loại enzyme. Phản ứng xảy ra ở một nhiệt độ cố định và kết quả có thể quan sát trực tiếp thông qua sự thay đổi màu pH của sản phẩm sau phản ứng (He et al., 2020).

1.3.2. Nguyên lí hoạt động của phương pháp PSR

Phương pháp PSR chỉ sử dụng dụng một loại enzyme duy nhất, sử dụng một cặp mồi được thiết kế đặc trưng và DNA polymerase để khuếch đại trình tự DNA mục tiêu dưới điều kiện đẳng nhiệt. Cặp mồi được thiết kế cho phản ứng PSR bao gồm mồi xuôi Ft và mồi ngược Bt (**Hình 1.5.**) (Liu et al., 2015) Trong đó, Ft bao gồm trình tự Nr và trình tự F theo chiều 5’-3’, trình tụ F có chiều dài từ 15 – 30 bp được xác định và là trình tự bổ sung chính xác cho một vùng trình tự tại đầu 3’ của trình tự mục tiêu; Bt bao gồm trình tự N và trình tự B theo chiều 5’-3’, B được xác định và bổ sung hoàn toàn cho 15-30 nucleotide của trình tự mục tiêu tại đầu 5’; trình tự N là trình tự đảo ngược không bổ sung của trình tự Nr, Nr không nhận dạng hay bổ sung cho F, N không nhận dạng hay bổ sung cho B. Phản ứng PSR có thể xảy ra ở nhiệt độ 60 – 65°C, trong đó, mạch đôi

của trình tự mục tiêu bị biến tính thành hai mạch đơn nhờ sự hiện diện của Betaine, trình tự F của Ft sẽ bắt vào trình tự Fc của mạch đơn tại mạch 3’-5’ của trình tự mục tiêu, nhờ sự hoạt động của DNA polymerase, mạch mới sẽ được tổng hợp kéo dài từ F tạo mạch mới chứa trình tự Bc, qua đó trình tự B của Bt sẽ liên kết và DNA polymerase kéo dài tổng hợp mạch tạo mạch chứa Nrc và Fc theo chiều 3’-5’, do trình tự Nr và N sẽ đảo ngược lại nhau và trình tự Nr và Nrc bổ sung cho nhau, vì thế mạch mới sẽ có cấu trúc cuộn tròn, đầu 3’ của Nrc có thể tiếp tục kéo dài mở rộng tạo cấu trúc vòng xoắn (Liu et al., 2015). Quá trình tương tự xảy ra với mạch 5’-3’ của trình tự mục tiêu ban đầu với sự hoạt động của mồi Bt.



Hình 1.5. Nguyên lý khuếch đại đẳng nhiệt vòng xoắn PSR

1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU HIỆN NAY

Nghiên cứu của A. Milton và cộng sự về phát triển phương pháp xét nghiệm polymerase spiral reaction (PSR) để phát hiện nhanh chóng *Staphylococcus aureus* trong thịt (Milton et al., 2021).

Nghiên cứu của K. Momin và cộng sự về phát triển phương pháp xét nghiệm polymerase spiral reaction (PSR) cho việc phát hiện *Salmonella* trong thịt heo và các sản phẩm từ thịt heo (Momin et al., 2020).

Nghiên cứu của Shiyu He và cộng sự về xét nghiệm axit nucleic của *Vibrio parahaemolyticus* bằng phương pháp polymerase spiral reaction (PSR) (He et al., 2020).

Nghiên cứu của V. Hieu và cộng sự về khảo sát điều kiện phản ứng polymerase spiral reaction trong việc phát hiện nhanh gen kháng methicillin của *Staphylococcus aureus* (Hieu et al., 2021).

Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Chủng vi khuẩn (ATCC)

Chủng *S. aureus* ATCC 29213 và các chủng vi khuẩn tham chiếu khác từ nguồn chủng chuẩn vi sinh vật (ATCC) (**Bảng 2.1.**), các chủng *S. aureus* phân lập từ các mẫu thực phẩm gồm mẫu thịt gà, mẫu tôm, mẫu thịt bò, mẫu thịt heo, mẫu thịt cá, mẫu sữa bò ở các chợ địa phương tại Tp. HCM.

Bảng 2.1. Chủng vi khuẩn tham chiếu (ATCC)

Chủng vi khuẩn	**Nguồn chủng chuẩn**
Staphylococcus aureus	ATCC 29213
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027
Listeria monocytogenes	ATCC 19115
Bacillus cereus	ATCC 14579
Streptococcus pyogenes	ATCC 19615
Salmonella enterica	ATCC 6539
Bacillus subtilis	ATCC 6051
Vibrio cholerae	ATCC 14035
Enterococcus faecalis	ATCC 29212
Escherichia coli	ATCC 25922

2.1.2. Mẫu thực phẩm

Thu thập các mẫu thực phẩm gồm mẫu thịt gà, mẫu tôm, mẫu thịt bò, mẫu thịt heo, mẫu thịt cá, mẫu sữa bò ở các chợ địa phương tại Tp. HCM.

Các mẫu được mã hoá sắp xếp theo thứ tự là ngày tháng năm thu mẫu, nguồn gốc, tên mẫu (**Bảng 2.2.**).

Ví dụ: Ngày 11 tháng 04 năm 2023 tại chợ Xóm Mới với mẫu cánh gà được mã hoá là 230411CAGXM.

Bảng 2.2. Mã hóa các mẫu được thu nhận

Nơi lấy mẫu	Ký hiệu	Loại thực phẩm	Ký hiệu	Vị trí mẫu	Ký hiệu
Bách Hóa Xanh	BHX	Gà	G	Đùi	ĐU
An Phú Đông	APĐ			Đầu	ĐA
Chợ Cầu	CC			Cổ	CO
Chợ Thạch Đà	TD			Cánh	CA
Chợ Xóm Chiếu	XC			Chân	CH
Chợ Xóm Mới	XM			Mề	ME
Chợ Vườn Lài	VL	Tôm	T		
Cầu Sơn	CS	Bò	B	Thịt	TH
Thị Nghè	TN			Gân	GA
		Heo	H	Thịt	TH
				Da	DA
				Thịt xay	TX
		Cá nạo	CN		
		Sữa bò	SB		

2.2. HÓA CHẤT, DỤNG CỤ VÀ THIẾT BỊ

2.2.1. Hóa chất

❖ Sodium chloride

Thông số kỹ thuật:

- Công thức hóa học: NaCl
- Khối lượng phân tử: 58,44 g/mol
- Điểm sôi: 1461°C (1013 hPa)
- Tỉ trọng: 2,17 g/cm^3 (20°C)
- Độ nóng chảy: 801°C
- Giá trị pH: 7 (H_2O)
- Áp suất hơi: 1,3 hPa (865°C)

Hình 2.1. Sodium chloride

(merckmillipore.com)

– Mật độ hàng loạt: 1140 kg/m^3

– Độ hòa tan: 358 g/l (20°C)

❖ Baird-Parker agar (base)

Thành phần:

– Agar: 20 g/L

– Beef extract: 5 g/L

– Glycine: 12 g/L

– Lithium chloride ($LiCl \cdot 6H_2O$): 5 g/L

– Sodium pyruvate: 10 g/L

– Tryptone: 10 g/L

– Yeast extract: 1 g/L

Hình 2.2. Baird-Parker agar (base)

(merckmillipore.com)

❖ Egg yolk tellurite emulsion

Thành phần:

– Terile egg-yolk: 200 ml

– NaCl: 4.25 g

– Potassium tellurite: 2.1 g

– Nước cất: thêm vào cho đủ 1000 ml.

Hình 2.3. Egg yolk tellurite emulsion

(merckmillipore.com)

❖ Tryptic Soy Broth

Thành phần:

- Pepton from casein 17.0 g/l
- Pepton from soymeal 3.0 g/l
- D(+)-Glucose monohydrate 2.5 g/l
- Sodium chloride 5.0 g/l
- di-Potassium hydrogen phosphate 2.5 g/l

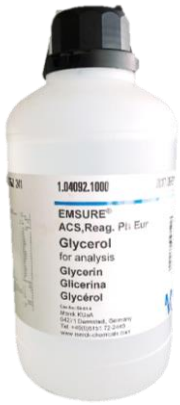
Hình 2.4. Tryptic Soy Broth

(merckmillipore.com)

❖ Glycerol

Thông số kỹ thuật:

- Công thức hóa học: $C_3H_8O_3$
- Khối lượng phân tử: 92.09 g/mol
- Điểm sôi: 290 °C (1013 hPa)
- Tỉ trọng: 1.261 g/cm^3 (20 °C)
- Độ nóng chảy: 400 °C
- Giá trị pH: 5.5 - 8 (H_2O)
- Áp suất hơi: <0.001 hPa (20 °C)



Hình 2.5. Glycerol

(merckmillipore.com)

❖ Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB)

Thông số kỹ thuật:

- Công thức hóa học: $C_{19}H_{42}BrN$
- Cấu trúc: tinh thể màu trắng
- Độ tinh khiết: >98%
- Giá trị pH: 5,0-7 (25°C, 36,4 g/L)

Hình 2.6. Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB)

(merckmillipore.com)

❖ Set nhuộm Gram

Thành phần:

- Crystak Violet
- Lugol
- Decolor
- Safranin

Hình 2.7. Set nhuộm Gram

(qa-lab.com.vn)

❖ Ethanol (96%)

Thông số kỹ thuật:

- Công thức hóa học: C_2H_5OH
- Khối lượng phân tử: 46.07 g/mol
- Điểm sôi: 78 °C (1013 hPa)
- Tỉ trọng: 0.805 - 0.812 g/cm3 (20 °C)
- Độ nóng chảy: 425 °C
- Giá trị pH: 7.0 (10 g/l, H_2O, 20 °C)
- Áp suất hơi: 59 hPa (20 °C)

Hình 2.8. Ethanol 96%

(merckmillipore.com)

❖ Immersion oil

Thông số kỹ thuật:

- Chiết suất (n 20/D): 1,515 - 1,517
- Mật độ (d 20 °C/ 4 °C): 1,0245 - 1,0265
- Truyền dẫn (380 nm; 1 cm): ≥ 65 %
- Truyền dẫn (400 nm; 1 cm): ≥ 78 %
- Truyền dẫn (450 nm; 1 cm): ≥ 90 %
- Huỳnh quang (dưới dạng quinine ở 365 nm): 1500 ppb

Hình 2.9. Immersion oil

(merckmillipore.com)

– Độ nhớt (20°C): 100 - 120 mPa·s

❖ Nước cất

❖ Nước khử ion

2.2.2. Chuẩn bị hóa chất

❖ Nước muối NaCl 0,9%

Hòa tan 9 g Sodium chloride (Merck) trong 1000 ml nước cất để thu nước muối có nồng độ 0,9%.

❖ Môi trường Paird-Parker

Hòa tan 63 g Paird-Parker base hòa tan trong 1000 ml nước cất và đun sôi để hòa tan môi trường. Khử trùng bằng đèn UV trong tủ cấy vi sinh và để nguội đến 60°C rồi bổ sung 50 ml Egg yolk tellurite emulsion phối trộn đều rồi đổ vào đĩa Petri vô trùng. Đĩa môi trường được bảo quản lạnh trong tủ mát.

❖ Ethanol 70%

Hòa tan 730 ml Ethanol 96% trong 270 ml nước cất để thu được 1000 ml Ethanol 70%.

Thay đổi thể tích thu được theo công thức

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Trong đó:

C_1: Nồng độ Ethanol ban đầu (96%)

C_2: Nồng độ Ethanol sau pha (70%)

V_1: Thể tích Ethanol ban đầu cần pha

V_2: Thể tích Ethanol sau khi pha

2.2.3. Dụng cụ

– Đĩa Petri nhựa 60mm x 15mm (Biologix)

– Chai trung tính 500 ml (Duran)

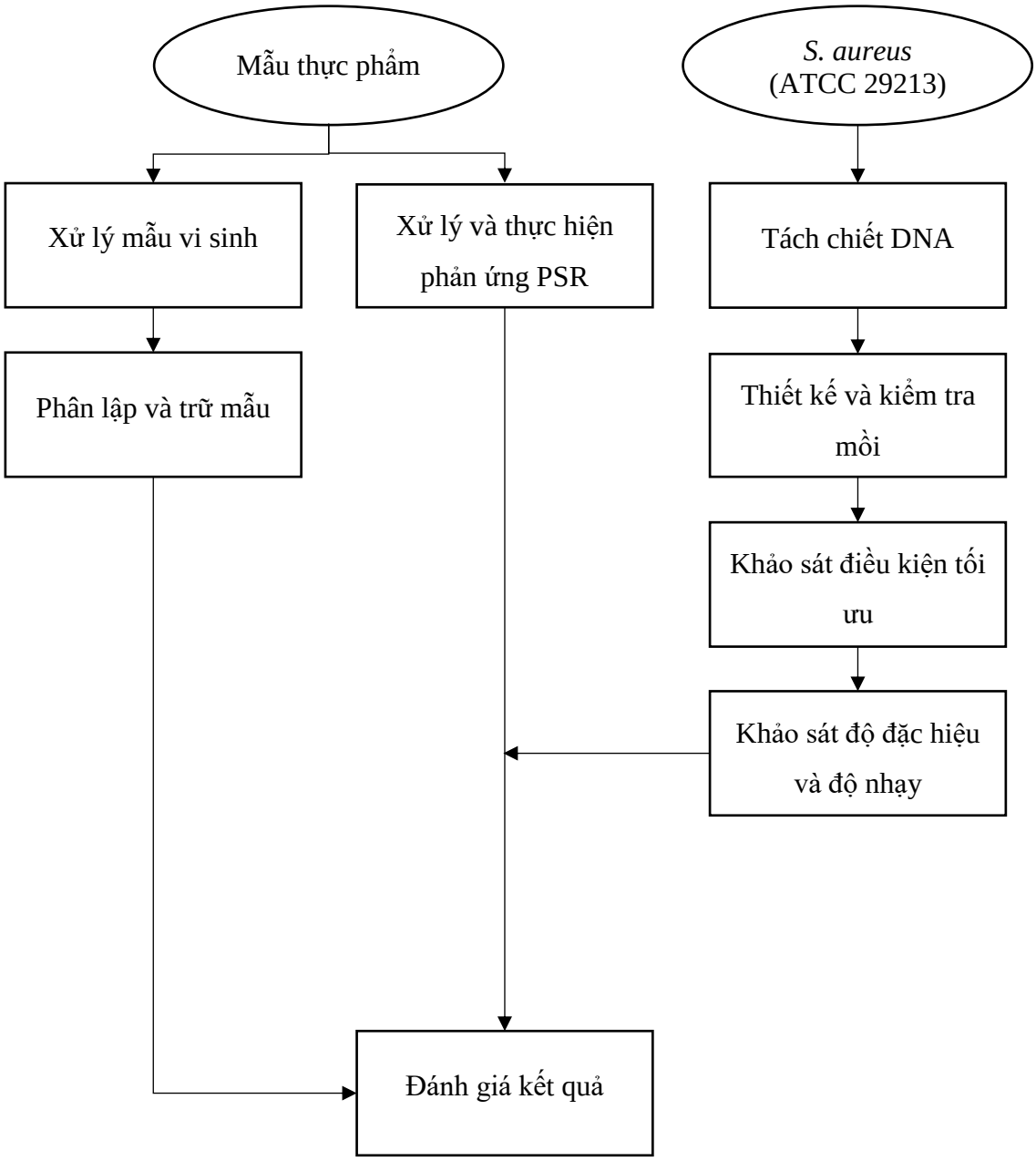
- Erlen thủy tinh 250 ml (Duran)
- Beaker thủy tinh 250 ml (Duran)
- Ống Falcon 15 ml, 50 ml (Biologix)
- Ống Eppendorf 1.5 ml (Biologix)
- Ống PCR 0.2ml (Biologix)
- Ống đong thủy tinh 100 ml (CMBL)
- Ống đong thủy tinh 250 ml (Duran)
- Giá đựng Falcon (OEM)
- Giá đựng Eppendorf 1.5 ml (Biologix)
- Micropipet 100-1000 µl (DragonLab)
- Micropipet 20-200 µl (DragonLab)
- Micropipet 2-20 µl (DragonLab)
- Đầu tip micropipet 10 µl, 200 µl, 1000 µl (Biologix)
- Que cấy vi sinh inox (OEM)
- Que cấy vi sinh nhựa (Biologix)
- Lam kính mài mờ 26x76x1mm (Duran)
- Tăm bông thân gỗ (OEM)
- Khăn giấy tiệt trùng (OEM)
- Thuyền cân nhựa hình thoi 100 ml (OEM)
- Muỗng cân hóa chất 2 đầu inox (OEM)
- Kéo thẳng đầu nhọn (OEM)
- Panh y tế (OEM)
- Bao tay y tế (Vglove)

2.2.4. Thiết bị

- Cân phân tích 4 số (Ohaus)
- Máy vortex mixers (Stuart)
- Máy ly tâm spindown (Cleaver Scientific)
- Máy ly tâm (Digisystem)
- Máy ly tâm lạnh microlitre (Cryste)
- Máy PCR (Cole-Parmer)
- Tủ ấm vi sinh (Esco)
- Tủ mát (Sanaky)
- Tủ đông (Haier)
- Tủ đông âm sâu (Haier)
- Tủ an toàn sinh học cấp 2 (OEM)
- Kính hiển vi sinh học (Zeiss)

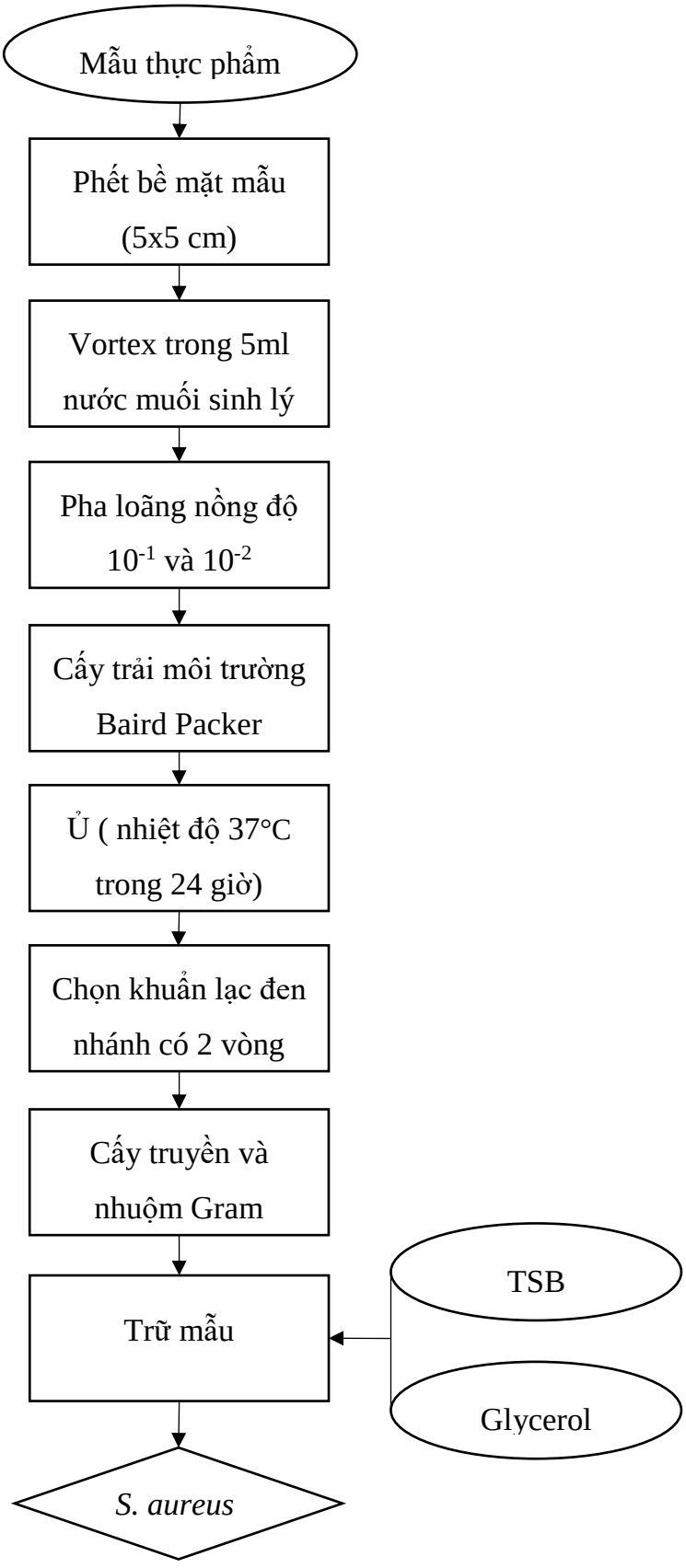
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sơ đồ quy trình thực hiện thí nghiệm được mô tả theo **Hình 2.10.** như sau:



Hình 2.10. Sơ đồ quy trình thực hiện thí nghiệm

2.3.1. Phân lập và lưu trữ vi khuẩn *S. aureus*



Hình 2.11. Sơ đồ phân lập và trữ mẫu vi khuẩn

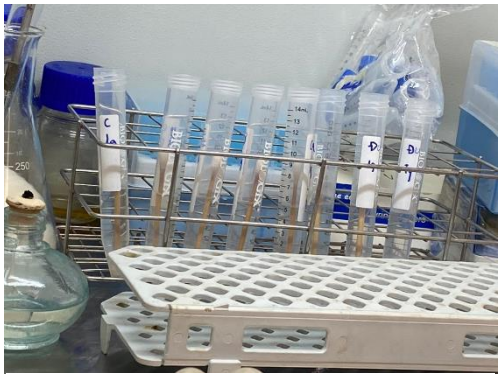
Cách tiến hành:

Mẫu thực phẩm được thu thập tại các chợ khu vực các quận ở Tp. HCM (**Hình 2.12.**). Lựa chọn bề mặt trên mẫu với kích thước 5x5 cm và tiến hành cắt bề mặt ra khỏi mẫu, sử dụng tăm bông vô trùng để phết lên bề mặt rồi cho vào ống falcon 15 ml (**Hình 2.13.**), thêm vào 5 ml nước muối NaCl (0.9%) và tiến hành vortex trong 15 giây để trộn đều hỗn hợp và pha loãng ra nồng độ 10^{-1} và 10^{-2} (**Hình 2.14.**). Sau đó hút 50 µl dung dịch để cấy trải trong môi trường Baird Parker (BP) để phân lập *S. aureus* (**Hình 2.15.**, **Hình 2.16.**). Ủ các đĩa môi trường trong tủ ủ nhiệt khô với nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Kiểm tra các đĩa môi trường xuất hiện khuẩn lạc *S. aureus* với các đặc điểm hình thái màu đen nhánh và có xuất hiện hai vòng trong và đục sau đó tiến hành đếm số lượng khuẩn lạc trên đĩa môi trường và ghi chú số lượng (**Hình 2.17.**).

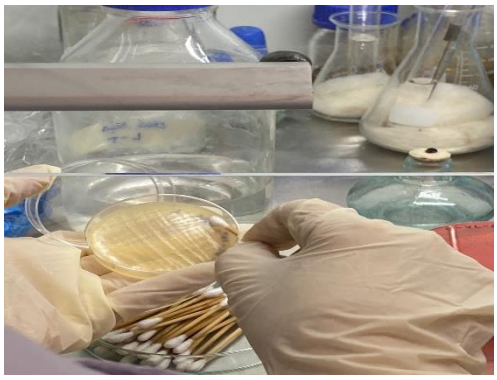
Hình 2.12. Chuẩn bị mẫu

Hình 2.13. Phết bề mặt mẫu

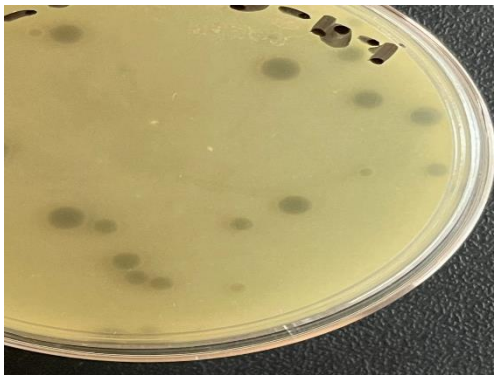
Hình 2.15. Bơm 50 µl dung dịch vào môi trường Paird-Parker



Hình 2.14. Trộn đều và pha loãng



Hình 2.16. Cấy trải



Hình 2.17. Xem hình thái khuẩn lạc

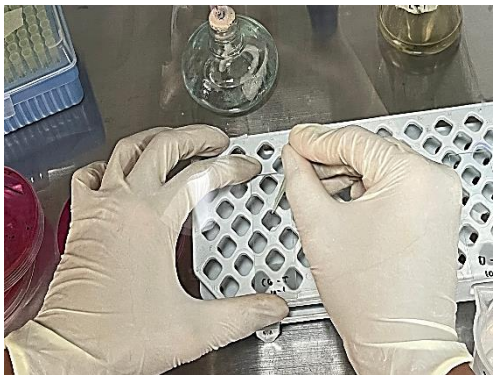
Lựa chọn khuẩn lạc *S. aureus* có những đặc điểm trên để nhuộm Gram như sau:

- Ghi chú và nhỏ nước cất lên mặt lam kính sạch (**Hình 2.18., Hình 2.19.**).
- Lựa chọn và dàn khuẩn lạc *S. aureus* lên lam kính (**Hình 2.20.**).
- Hơ lam kính dưới đèn cồn để cố định khuẩn và để nguội (**Hình 2.21.**).
- Phủ dung dịch Crystak Violet vào mặt khuẩn để nhuộm trong 1 phút rồi rửa dưới nước nhỏ giọt (tránh để nước nhỏ giọt trực tiếp mặt khuẩn) và loại bỏ nước còn sót lại.
- Phủ dung dịch Glugol để cố định màu vào vi khuẩn trong 1 phút rồi rửa dưới nước nhỏ giọt (tránh để nước nhỏ giọt trực tiếp mặt khuẩn) và loại bỏ nước còn sót lại.
- Tẩy màu bằng dung dịch Decolor trong 30 giây, loại bỏ màu Crystak Violet còn sót lại ngoại trừ các vi khuẩn bắt màu được Glugol cố định rồi rửa dưới nước nhỏ giọt (tránh để nước nhỏ giọt trực tiếp mặt khuẩn) và loại bỏ nước còn sót lại.
- Cuối cùng phủ dung dịch Safranin trong 1 phút để vi khuẩn đã tẩy màu Crystak Violet bắt lại màu đỏ của Safranin rồi rửa dưới nước nhỏ giọt (tránh để nước nhỏ giọt trực tiếp mặt khuẩn) và loại bỏ nước còn sót lại.
- Cho lam kính sau khi nhuộm vào tủ sấy từ 2-3 phút để làm khô hoàn toàn.

Sau đó thêm Immersion oil vào lam kính rồi đặt cố định trên kính hiển vi và điều chỉnh thấu kính, tiêu cự (**Hình 2.22.**) nhằm xác định hình thái khuẩn lạc là các tụ cầu khuẩn màu tím (**Hình 2.23.**).

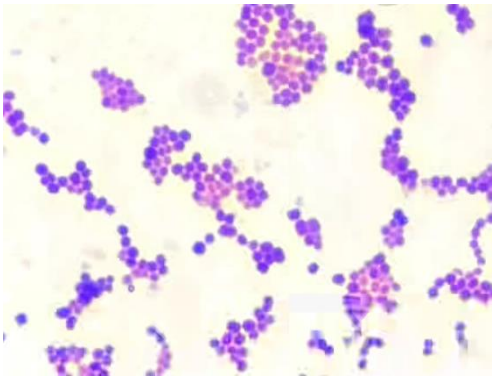
Hình 2.19. Ghi chú lam kính

Hình 2.18. Bơm nước cất vào lam kính

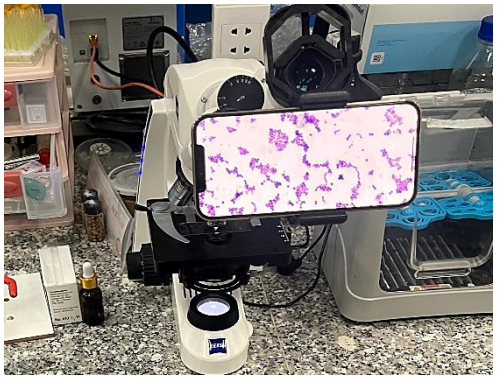


Hình 2.20. Lựa chọn và dàn khuẩn lạc

Hình 2.21. Hơ lam kính



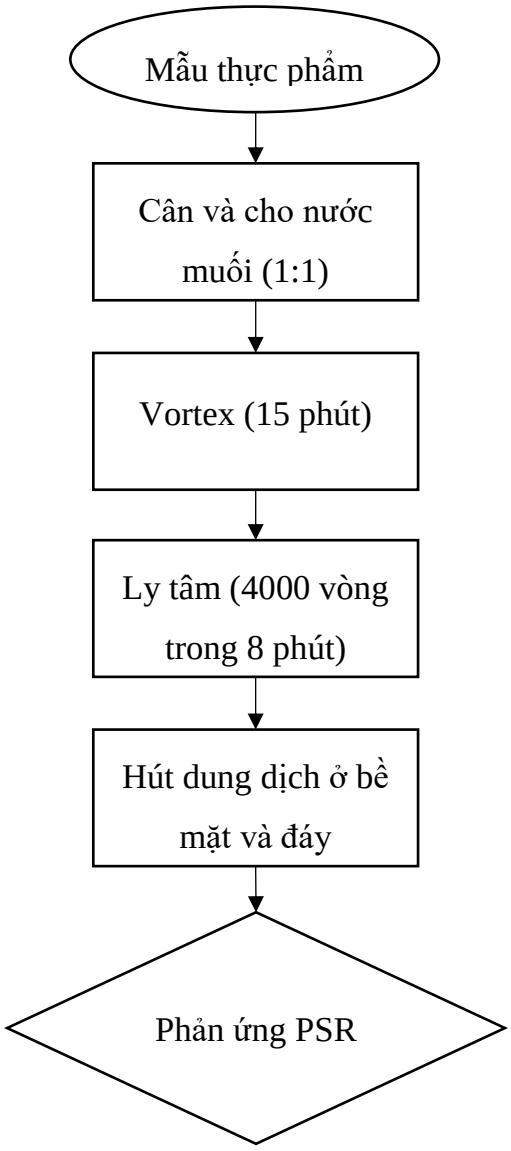
Hình 2.23. Soi hình thái khuẩn lạc



Hình 2.22. Điều chỉnh kính hiển vi

Trữ mẫu *S. aureus* sau khi phân lập với thể tích tổng 1 ml dung dịch gồm 700 µl TSB và 300 µl Glycerol. Đầu tiên hút 700 µl TSB vào eppendoft 1.5 ml và lựa chọn khuẩn *S. aureus* bằng que cấy nhựa vào epp có chứa 700 µl TSB rồi tiến hành vortex trong 15 giây. Tiến hành ủ hỗn hợp trong tủ ủ nhiệt khô với nhiệt độ 37°C trong vòng 24 giờ. Bổ sung 300 µl Glycerol vào epp đã ủ và vortex để trộn đều hỗn hợp. Đưa các epp làm lạnh lần lượt ở tủ 4°C trong 2 giờ, tủ –20°C trong 12 giờ và tủ –80°C để lưu trữ mẫu (**Hình 2.11.**).

2.3.2. Xử lý và thực hiện phản ứng PSR trên mẫu thực phẩm



Hình 2.24. Sơ đồ xử lý mẫu thực phẩm và thực hiện phản ứng PSR

Cách tiến hành:

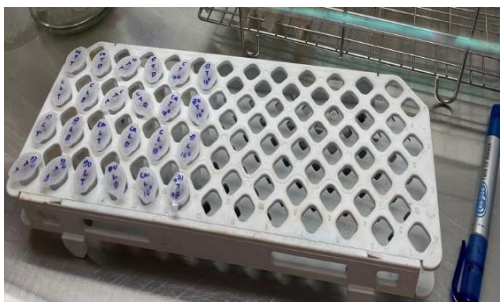
Cắt nhỏ mẫu thịt và tiến hành cân khối lượng bằng cân phân tích 4 số (**Hình 2.25.**) sau đó cho nước muối với tỉ lệ 1:1 với số cân (**Hình 2.26.**). Vortex hỗn hợp trong vòng 15 phút để hòa tan dung dịch (**Hình 2.27.**). Hút dung dịch vào falcon 50 ml và ly tâm 4000 vòng với nhiệt độ 4°C trong 8 phút (**Hình 2.28.**). Sau khi ly tâm tiến hành ghi chú và hút 1ml dung dịch bề mặt vào eppendoft 1. 5 ml (**Hình 2.29., Hình 2.30.**).

Hình 2.25. Cân mẫu

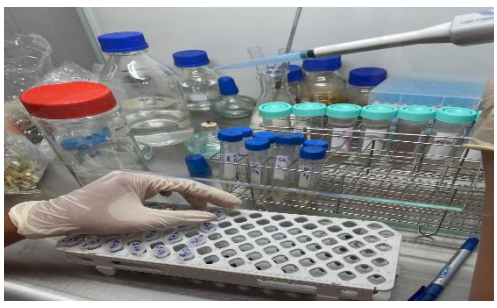
Hình 2.26. Cho nước muối tỷ lệ 1:1 (g/ml)

Hình 2.27. Vortex hỗn hợp

Hình 2.28. Cho dung dịch vào falcon 50ml để ly tâm



Hình 2.29. Ghi chú vào epp 1.5ml



Hình 2.30. Bơm 1ml dung dịch vào epp 1.5 ml

2.3.3. Tách chiết DNA vi khuẩn *S. aureus*

Chuẩn bị mẫu vi khuẩn *S. aureus* để tách chiết bằng các cách sử dụng chủng *S. aureus* ATCC 29213 được nuôi cấy trong môi trường Baird Packer tiến hành lấy 1 khuẩn lạc đơn bằng que cấy và cho vào eppendorf 1.5 ml có chứa 1 ml môi trường TSB rồi đem tăng sinh trong thiết bị lắc ổn nhiệt ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ.

Cách tiến hành:

DNA của chủng *S. aureus* được tách chiết theo phương pháp Chloroform/ CTAB (Minas et al., 2011). Quy trình tách chiết DNA như sau:

- Bước 1: Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn *S. aureus* và tiến hành lắc qua đêm bằng máy lắc ngang.
- Bước 2: Hút 1 ml dung dịch vi khuẩn vào eppendorf 1.5 ml và ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút.
- Bước 3: Loại bỏ dịch nổi trên bề mặt eppendorf 1.5 ml và thu sinh khối vi khuẩn.
- Bước 4: Cho 800 µl dung dịch CTAB vào eppendorf 1.5 ml và tiến hành vortex kỹ trong vài phút.
- Bước 5: Đặt eppendorf 1.5 ml vào ủ trong tủ ủ nhiệt khô ở 60°C trong 1 giờ.
- Bước 6: Ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút.
- Bước 7: Hút 600 µl dịch nổi bề mặt và cho 600 µl PCI và vortex kỹ rồi tiến hành ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút.
- Bước 8: Hút 400 µl dịch nổi bề mặt và cho 400 µl PCI và vortex kỹ rồi tiến hành ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút.
- Bước 9: Hút 200 µl dịch nổi bề mặt và thêm vào 500 µl Ethanol (99%) và vortex đều. Sau đó ủ qua đêm ở –80°C.
- Bước 10: Loại bỏ dịch nổi và bổ sung 500 µl Ethanol (99%) rồi tiến hành ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút.
- Bước 11: Thực hiện công đoạn loại bỏ dịch nổi 2 lần.

– Bước 12: Đem phơi khô và cho 100 µl H_2O.

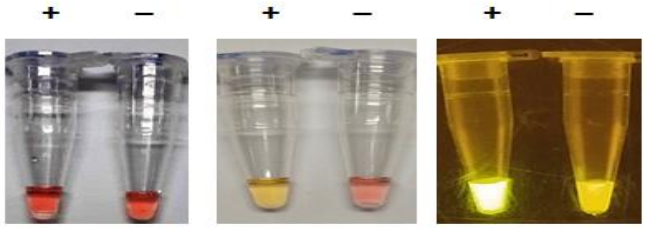
Kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 260 nm và 280 nm với tỉ lệ tinh sạch thích hợp cho các phân tích sinh học phân tử nằm trong khoảng 1,8 – 2,2. Các DNA sau khi tách chiết sẽ được lưu trữ ở –20°C.

2.3.4. Phương pháp thiết kế mồi PSR đặc trưng cho *S. aureus*

Gen *spa* với mã hiệu là CP132365.1 từ ngân hàng dữ liệu gene (NCBI) được lựa chọn làm gen mục tiêu phát hiện do tính ổn định và độ bảo tồn cao của trình tự gen ở *S. aureus*. Trình tự mồi PSR được thiết kế bằng chương trình Primer explorer (*primerexplorer.jp/e/*), với đoạn N và Nr được thiết kế dựa trên nghiên cứu của Liu và cộng sự (2015) (Liu et al., 2015). Các trình tự mồi được kiểm tra lại bằng PCR insilico (*insilico.ehu.es/PCR/*) và NCBI Blast (*ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/*). Sau đó các mồi thiết kế được đặt tổng hợp tại Công ty Phù Sa Genomics (Việt Nam).

2.3.5. Phương pháp đọc kết quả PSR

Sản phẩm PSR được quan sát trực tiếp bằng màu sắc phản ứng thông qua chỉ thị pH. Sản phẩm PSR được khuếch đại với lượng lớn trong kết quả cuối cùng, làm giảm pH sau phản ứng. Theo đó, màu hồng sáng của phản ứng ban đầu thay đổi thành vàng với phản ứng dương và giữ nguyên màu sắc ban đầu với phản ứng âm (**Hình 2.31. A, Hình 2.31. B**). Đồng thời, sản phẩm có thể quan sát bằng nhuộm chất phát huỳnh quang SYBR Green và soi dưới ánh sáng 460 nm (**Hình 2.31. C**).



A B C

Hình 2.31. Kết quả phản ứng PSR

(A): Trước phản ứng; (B), (C): Sau phản ứng

2.3.6. Phương pháp phát hiện gen *spa* đặc trưng của *S. aureus* bằng phản ứng PSR

Tất cả các phản ứng PSR thực hiện trong nghiên cứu này được thực hiện với thể tích cuối cùng là 15 µl. Các phản ứng PSR ban đầu trước khảo sát điều kiện tối ưu cho

phản ứng sẽ dùng chương trình phản ứng PSR thực hiện với thông số phản ứng PSR (**Bảng 2.3.**) và thành phần phản ứng PSR (**Bảng 2.4.**) dựa theo nghiên cứu trước đó.

Thí nghiệm sẽ thực hiện với đối chứng âm, nước được sử dụng thay thế cho trình tự mục tiêu, đối chứng dương sử dụng DNA mục tiêu dạng tổng hợp cho phản ứng.

Bảng 2.3. Chương trình phản ứng PSR

STT	Bước thực hiện	Nhiệt độ	Thời gian
1	Bắt cặp, kéo dài, tạo ra sản phẩm	65°C	50 phút

Bảng 2.4. Thành phần phản ứng PSR

STT	Thành phần	Thể tích (µl)	Nồng độ (µM)
1	Nước khử ion	0,58	
2	N-F	0,96	1,6
3	Nr-B	0,96	1,6
4	WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (NEB)	7,5	1X
5	Mạch khuôn DNA	5	
Tổng thể tích 15 µl/ phản ứng			

Cách tiến hành:

- Bước 1: Chuẩn bị Colorimetric LAMP 2X Master Mix, mồi, mạch khuôn (DNA tách chiết và tế bào của *S. aureus* ATCC 29213), nước khử ion.
- Bước 2: Vệ sinh khu vực thực hiện thí nghiệm.
- Bước 3: Pha hỗn hợp phản ứng PSR.
- Bước 4: Trộn đều, spindown hỗn hợp PSR.
- Bước 5: Hút 10 µl hỗn hợp PSR đã trộn đều + 5 µl mạch khuôn.
- Bước 6: Thiết lập máy PCR ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 60 phút.

- Bước 7: Quan sát sự thay đổi màu sắc ở mẫu DNA tách chiết, tế bào vi khuẩn và đánh giá kết quả thí nghiệm.

2.3.7. Khảo sát điều kiện phản ứng PSR

2.3.7.1. Phương pháp khảo sát nhiệt độ tối ưu cho phản ứng PSR.

Enzyme *Bst* DNA polymerase có dải nhiệt độ hoạt động kéo dài, enzyme được sử dụng trong nghiên cứu này có dải nhiệt độ thích hợp cho phản ứng PSR là từ 55 – 68°C khoảng cách giữa các nghiệm thức khảo sát là 1°C và cũng là nhiệt độ tối ưu cho quá trình bắt cặp kéo dài tạo sản phẩm PSR. Việc xác định nhiệt độ các phản ứng PSR được thực hiện với thể tích là 15 µl và khảo sát lặp lại 3 lần.

2.3.7.2. Phương pháp khảo sát thời gian của phản ứng PSR.

Tiến hành khảo sát phản ứng trong khoảng 20 – 75 phút phản ứng, mỗi khoảng cách nhau 5 phút. Các điều kiện khác không thay đổi, kết quả được kiểm tra bằng màu sắc và khảo sát lặp lại 3 lần.

2.3.8. Khảo sát giới hạn phát hiện của phản ứng PSR

Tế bào vi khuẩn nuôi cấy được pha loãng theo bậc 10 liên tiếp về các nồng độ khác nhau và thực hiện phản ứng với các điều kiện tối ưu. Kết quả được thể hiện qua sự thay đổi màu pH ở nồng độ pha loãng thấp nhất.

2.3.9. Khảo sát tính đặc hiệu của mồi phản ứng PSR

Trong khảo sát này, các vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm được sử dụng để thực hiện phản ứng PSR gồm *S. aureus, P. aeruginosa, L. monocytogenes, B. cereus, S. pyogenes, S. enterica, B. subtilis, V. cholera, E. faecalis, E. coli* với các thành phần và điều kiện đã được khảo sát. Yêu cầu kết quả phản ứng PSR với bộ mồi được thiết kế chỉ xảy ra phản ứng đặc hiệu với *S. aureus.*

2.3.10. Đánh giá kết quả phân lập *S. aureus* trong thực phẩm bằng phương pháp vi sinh

Tiến hành đếm số lượng khuẩn lạc trên mỗi đĩa chứa từ 30 – 300 khuẩn lạc và thực hiện tính toán số lượng tế bào vi khuẩn trong 1 ml huyền phù ban đầu theo công thức sau:

$$N = \frac{A}{V \times Df}$$

Trong đó

N: tổng số CFU/ml (CFU/g) mẫu đem phân tích

A: số CFU trung bình trên mỗi đĩa petri ở độ pha loãng nhất định (CFU)

V: thể tích mẫu cấy trên mỗi đĩa petri (ml)

Df: độ pha loãng mẫu.

So sánh kết quả số lượng với giới hạn cho phép của *S. aureus* trong thực phẩm thuộc Quyết định 46/2007/QĐ-BYT của Bộ Y tế về giới hạn tối đa cho phép đối với các chỉ tiêu vi sinh vật trong thực phẩm.

2.3.11. Đánh giá kết quả phát hiện *S. aureus* trong thực phẩm bằng phản ứng PSR

Tiến hành thực hiện phản ứng PSR theo thông số đã tối ưu để phát hiện *S. aureus* trong thực phẩm. So sánh đối chiếu với phương pháp nuôi cấy vi sinh truyền thống và đánh giá được độ tin cậy của phương pháp PSR với việc phát hiện tác nhân gây bệnh trong thực phẩm.

2.3.12. Thống kê kết quả phát hiện *S. aureus* trong thực phẩm

Sau khi có được kết quả phát hiện *S. aureus* trong thực phẩm bằng phản ứng PSR qua đó đánh giá được độ đặc hiệu và độ nhạy của phản ứng so với phương pháp vi sinh theo TCVN 12365-2:2018 (ISO 16140-2:2016) (**Bảng 2.5.**).

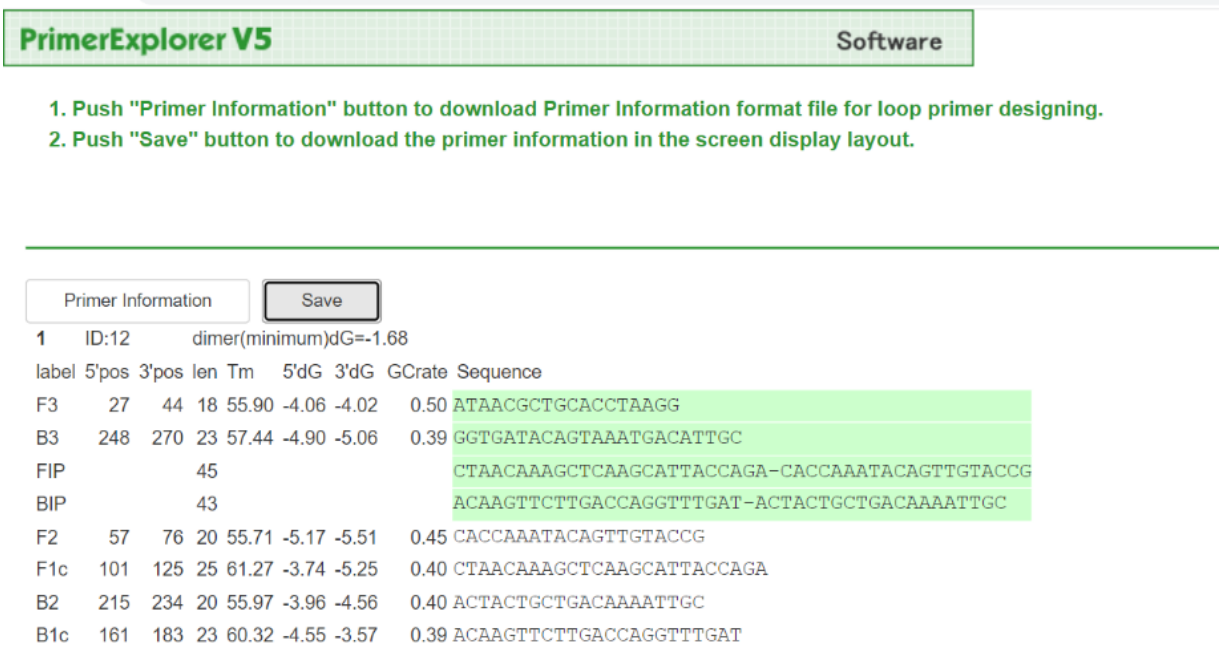
Bảng 2.5. Đánh giá kết quả của phản ứng PSR

Kết quả	**Dương tính (PSR)**	**Âm tính (PSR)**
Dương tính (vi sinh)	Dương tính thật	Dương tính giả
Âm tính (vi sinh)	Âm tính giả	Âm tính thật
Độ nhạy: Dương tính thật / (Dương tính thật + Âm tính giả) **Độ đặc hiệu**: Âm tính thật / (Dương tính giả + Âm tính thật)		

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ MỒI PSR ĐẶC TRƯNG PHÁT HIỆN *S. aureus*

Các đoạn mồi PSR được thiết kế bằng chương trình PrimerExplorer (*primerexplorer.jp/e/*) trên vùng gen *spa* của *S. aureus* từ ngân hàng dữ liệu gen (NCBI) (**Hình 3.1.**), với kết quả lựa chọn được một cặp mồi có các thông số kỹ thuật tốt nhất (**Bảng 3.1.**).



Hình 3.1. Thiết kế mồi gen *spa* bằng chương trình PrimerExplorer

Bảng 3.1. Trình tự cặp mồi cho phản ứng PSR

Mồi	Độ dài (bp)	Trình tự (5’ – 3’)
N-F	41	gattcgtacatagaaggatccCACCAAATACAGTTGTACCG
Nr-B	41	cctaggaagatacatgcttagACTACTGCTGACAAAATTGC

Các trình tự mồi được kiểm tra độ đặc hiệu bằng PCR insilico (*insilico.ehu.es/PCR/*) (**Hình 3.2.**) và NCBI Plast *(ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)* (**Hình 3.3.**) để đánh giá mô phỏng hoạt động mồi trên vi khuẩn *S. aureus.*

Hình 3.2. Kết quả kiểm tra trình tự mồi bằng PCR insilico

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CACCAAATACAGTTGTACCG	20	54.35	45.00	6.00	2.00
Reverse primer	ACTACTGCTGACAAAATTGC	20	54.51	40.00	4.00	2.00

Products on target templates

>CP132365.1 Staphylococcus aureus strain UNC_SA54 chromosome, complete genome

```
product length = 178
Forward primer  1        CACCAAATACAGTTGTACCG  20
Template        2327238  ....................  2327257

Reverse primer  1        ACTACTGCTGACAAAATTGC  20
Template        2327415  ....................  2327396
```

>CP132371.1 Staphylococcus aureus strain UNC_SA38 chromosome, complete genome

```
product length = 178
Forward primer  1        CACCAAATACAGTTGTACCG  20
Template        2305756  ....................  2305775

Reverse primer  1        ACTACTGCTGACAAAATTGC  20
Template        2305933  ....................  2305914
```

>CP132033.1 Staphylococcus aureus strain 2.1 chromosome, complete genome

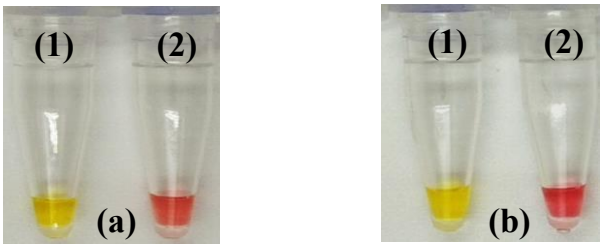
```
product length = 178
Forward primer  1      CACCAAATACAGTTGTACCG  20
Template        77273  ....................  77292

Reverse primer  1      ACTACTGCTGACAAAATTGC  20
Template        77450  ....................  77431
```

Hình 3.3. Kết quả kiểm tra trình tự mồi bằng NCBI Blast

3.2. THIẾT LẬP PHẢN ỨNG PSR PHÁT HIỆN GEN *spa* ĐẶC TRƯNG CỦA *S. aureus*

Tiến hành kiểm tra mồi bằng phản ứng PSR với nhiệt độ tại 65°C trong 45 phút ở mẫu tế bào vi khuẩn chứa 10^4 cfu/phản ứng và mẫu DNA tách chiết có nồng độ 1 ng/phản ứng. Thông qua kết quả trên cho thấy không có sự khác biệt về chỉ thị màu giữa hai mẫu DNA tách chiết và tế bào vi khuẩn như trên (**Hình 3.4.**) từ đó cho thấy được khả năng phát hiện nhanh tác nhân *S. aureus* bằng phản ứng PSR mà không cần thông qua quá trình tách chiết DNA như phương pháp PCR.



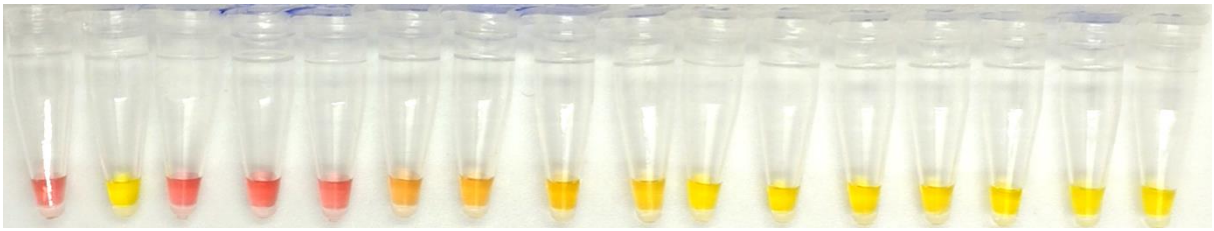
Hình 3.4. Phản ứng PSR kiểm tra hoạt động của mồi

(1): Mẫu dương (*S. aureus* ATTC 29213); (2): Chứng âm (Nước khử ion)

a): Mẫu DNA tách chiết; b): mẫu tế bào

3.3. TỐI ƯU QUY TRÌNH PSR PHÁT HIỆN *S. aureus*

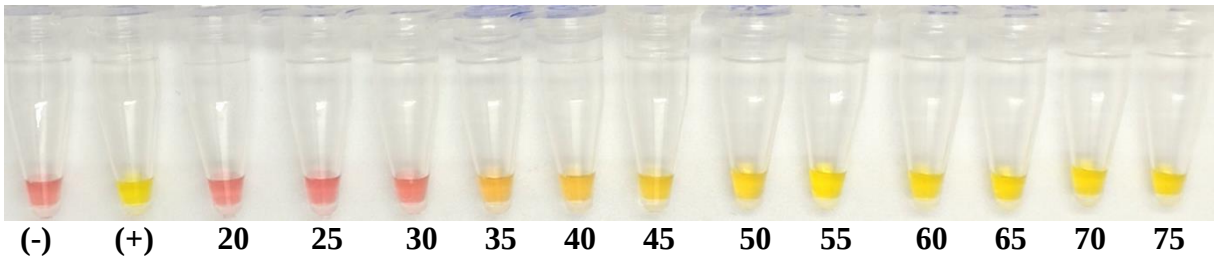
Nhiệt độ phản ứng PSR được khảo sát trong khoảng nhiệt độ (55 – 68)°C khoảng cách giữa các nghiệm thức khảo sát là 1°C. Thực hiện phản ứng trên máy PCR được thiết lập nhiệt độ tương ứng với thời gian ủ là 45 phút trong mẫu tế bào vi khuẩn chứa 10^4 cfu/phản ứng. Thông qua kết quả quan sát trực tiếp bằng mắt thường cho thấy tại nhiệt độ 63°C (**Hình 3.5.**) có sự thay đổi màu sắc từ hồng sang vàng rõ ràng so với đối chứng âm và cũng là nhiệt độ tối ưu cho quá trình bắt cặp kéo dài tạo sản phẩm PSR. Quy trình đẳng nhiệt ở 63°C, không cần chu trình nhiệt như phương pháp PCR.



Hình 3.5. Kết quả khảo sát nhiệt độ phản ứng PSR

(+): Chứng dương (*S. aureus* ATTC 29213); (–): Chứng âm (Nước khử ion)

Thời gian phản ứng PSR được khảo sát trong khoảng (20 – 75) phút khoảng cách giữa các nghiệm thức khảo sát là 5 phút và thực hiện trên máy PCR được thiết lập thời gian ủ tương ứng với nhiệt độ tối ưu 63°C (**Hình 3.6.**). Thông qua khảo sát trực tiếp bằng mắt thường có thể thấy sự thay đổi màu sắc từ 35 phút trở đi và rõ ràng nhất ở 50 phút được cho là thời gian tối ưu cho phản ứng PSR và ngắn hơn so với thời gian 4-5 ngày của phương pháp vi sinh truyền thống.

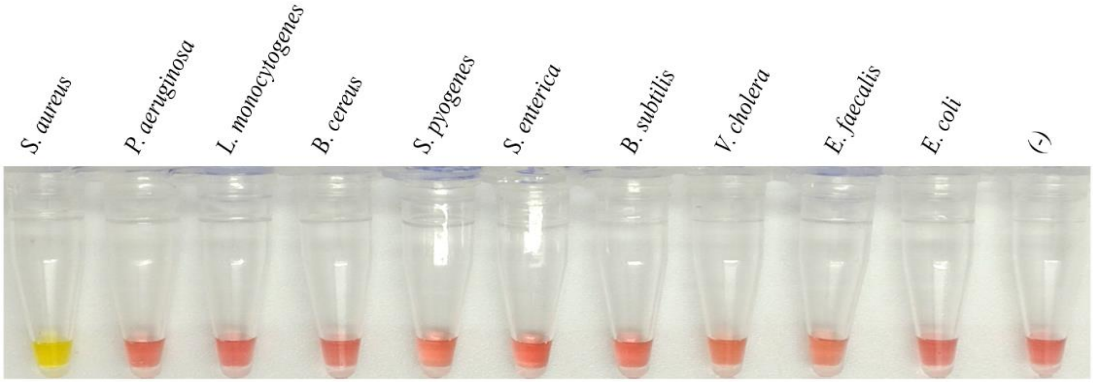


Hình 3.6. Kết quả khảo sát thời gian phản ứng PSR

(+): Chứng dương (*S. aureus* ATTC 29213); (–): Chứng âm (Nước khử ion)

3.4. TÍNH ĐẶC HIỆU CỦA BỘ MỒI PSR THIẾT KẾ ĐẶC TRƯNG CHO *S. aureus*

Tính đặc hiệu của phản ứng PSR được kiểm tra chéo với các chủng vi khuẩn khác và kết quả cho thấy các đoạn mồi thiết kế bắt cặp đặc hiệu và chỉ khuếch đại gen *spa* trên *S. aureus*, không xảy ra phản ứng chéo với các vi khuẩn khác (**Hình 3.7.**).



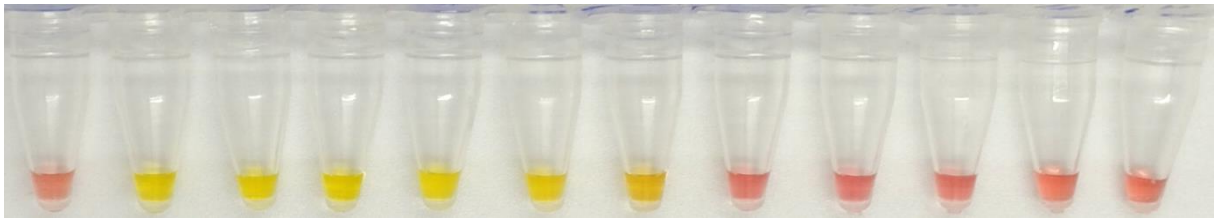
Hình 3.7. Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu của cặp mồi

(+): Chứng dương (*S. aureus* ATTC 29213); (–): Chứng âm (Nước khử ion)

3.5. GIỚI HẠN PHÁT HIỆN CỦA PSR VỚI TẾ BÀO VI KHUẨN S. aureus

Pha loãng nồng độ tế bào vi khuẩn *S. aureus* theo bậc 10 liên tiếp từ 10^4 – 10^{-5} cfu/phản ứng. Kết quả quan sát trực tiếp bằng mắt thường cho thấy sự thay đổi màu sắc phản ứng xảy ra ở nồng độ là 10^4 – 10^0 cfu/phản ứng (**Hình 3.8.**). Qua đó cho biết nồng

độ pha loãng 10^0 cfu/phản ứng là nồng độ tế bào vi khuẩn thấp nhất có thể phát hiện bằng quy trình PSR đã tối ưu. Phương pháp có giới hạn phát hiện 1cfu/phản ứng thấp hơn so với phương pháp vi sinh truyền thống.



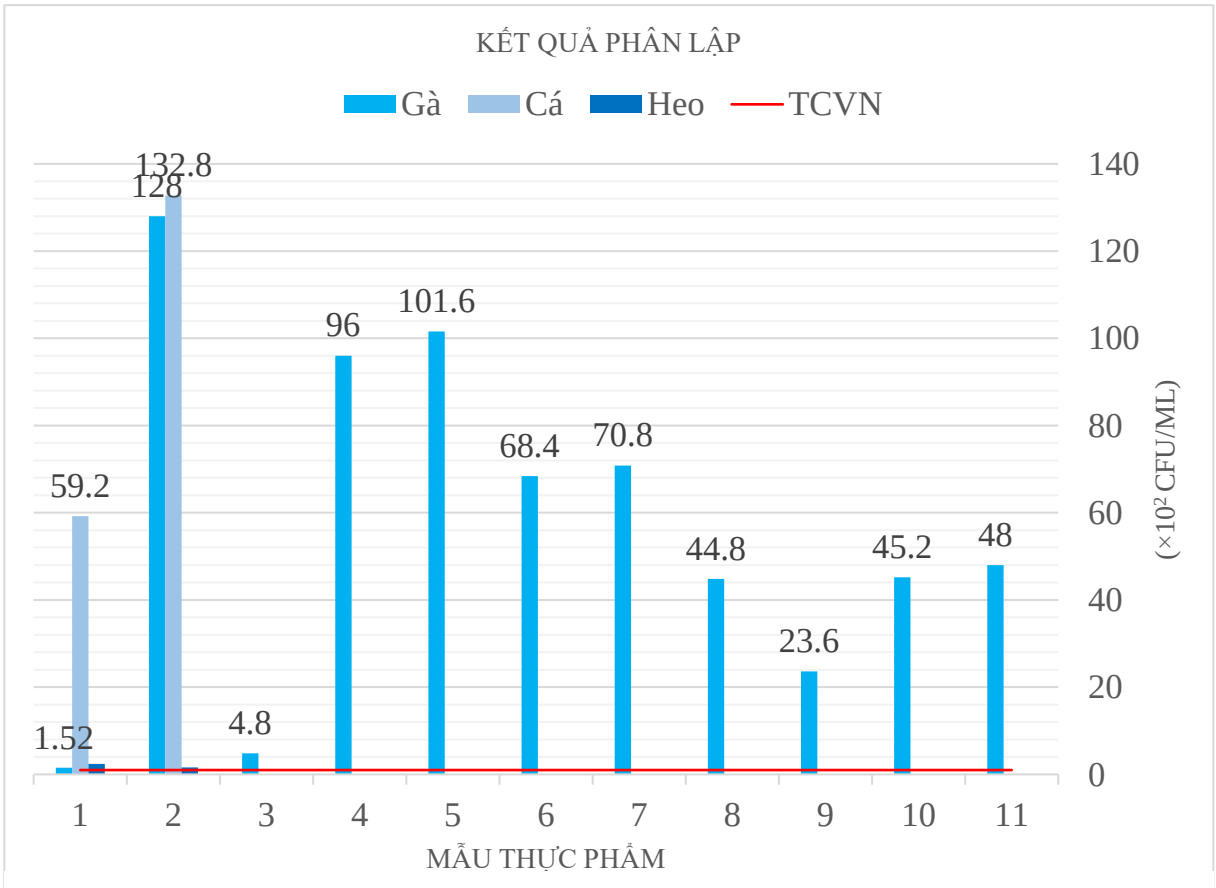
(–) (+) 10^4 10^3 10^2 10^1 10^0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}

Hình 3.8. Kết quả khảo sát giới hạn phát hiện tế bào vi khuẩn

(+): Chứng dương (*S. aureus* ATTC 29213); (–): Chứng âm (Nước khử ion)

3.6. KẾT QUẢ PHÂN LẬP *S. aureus* BẰNG PHƯƠNG PHÁP VI SINH

Kết quả phân lập (**Hình 3.9.**) cho thấy có 15 mẫu có sự hiện diện của *S. aureus* gồm 11 mẫu gà, 2 mẫu heo, 2 mẫu cá trên tổng số 35 mẫu thực phẩm. Tổng số *S. aureus* có trong các mẫu thực phẩm đạt từ 1,52 $\times 10^2$CFU/ml – 132,6 $\times 10^2$CFU/ml.



Hình 3.9. Kết quả phân lập trong thực phẩm

So sánh kết quả với Quyết định 46/2007/QĐ-BYT của Bộ Y tế về giới hạn tối đa cho phép đối với các chỉ tiêu vi sinh vật trong thực phẩm cho thấy các mẫu thu thập đều vượt giới hạn cho phép của *S. aureus* trong thực phẩm là 10^2 CFU/ml.

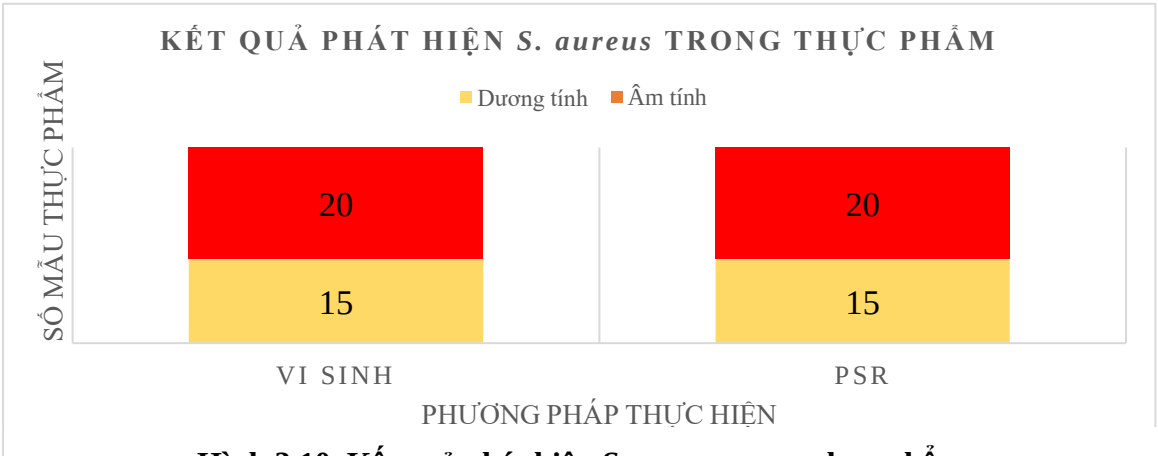
Trong nghiên cứu này, Tổng số mẫu thực phẩm nhiễm *S. aureus* chiếm tỷ lệ là 42,85%. Trong đó mẫu gà chiếm tỷ lệ nhiễm *S. aureus* cao nhất với 84,6% trong tổng số mẫu gà được thu thập, tiếp đó mẫu cá và mẫu heo chiếm tỷ lệ lần lượt là 66,7% và 22,2%. (**Bảng 3.2.**).

Bảng 3.2. Tỷ lệ nhiễm *S. aureus* trong thực phẩm

STT	Loại thực phẩm	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Mức độ nhiễm trung bình (CFU/ml)	Số mẫu không đạt tiêu chuẩn	Tỷ lệ mẫu không đạt tiêu chuẩn (%)
1	Gà	84,6%	53,6 ×102	11	84,6%
2	Heo	22,2%	2 ×102	2	22,2%
3	Cá	66,7%	96 ×102	2	66,7%
	Tổng	42,85%		15	42,85%

3.7. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÁT HIỆN S. aureus TRONG THỰC PHẨM CỦA PHẢN ỨNG PSR

Nhằm đánh giá khả năng phát hiện *S. aureus* hiện diện trong thực phẩm. Nghiên cứu này được tiến hành phản ứng PSR với 35 mẫu phết hoặc mẫu nước ngâm thực phẩm. Kết quả phản ứng gồm 15 mẫu dương tính tương đương với kết quả của phương pháp nuôi cấy vi sinh truyền thống (**Hình 3.10.**). Điều đó chứng minh phương pháp PSR phát hiện *S. aureus* trong thực phẩm hoạt động tốt và cho kết quả có độ tin cậy cao.



Hình 3.10. Kết quả phát hiện *S. aureus* trong thực phẩm

3.8. THỐNG KÊ KẾT QUẢ PHÁT HIỆN *S. aureus* TRONG THỰC PHẨM

Thực hiện phản ứng PSR trong 35 mẫu thực phẩm cho ra kết quả dương tính thật là 15/15 mẫu và dương tính giả 0/15 mẫu, âm tính thật 20/20 mẫu và âm tính giả 0/20 mẫu. Qua đó cho thấy bước đầu độ tin cậy của phản ứng PSR là 100% và độ nhạy của phản ứng PSR là 100% (**Bảng 3.3.**).

Bảng 3.3. Đánh giá độ đặc hiệu, độ nhạy của phản ứng PSR trong các mẫu thực phẩm

Kết quả	Dương tính (PSR)	Âm tính (PSR)	Tổng
Dương tính (Vi sinh)	15	0	15
Âm tính (Vi sinh)	0	20	20
Tổng	15	20	35
Độ đặc hiệu: 100% Độ nhạy: 100%			

3.9. THẢO LUẬN

Phương pháp PSR có điểm đặc trưng là khuếch đại DNA trong điều kiện đẳng nhiệt dao động từ (50 – 70)°C . Trong nghiên cứu này, thực hiện khảo sát nhiệt độ phản ứng PSR cho thấy ở nhiệt độ 63°C cho kết quả khuếch đại đạt hiệu suất cao nhất là điều kiện thích hợp cho mồi gắn vào mạch khuôn.

Sau đó thực hiện khảo sát thời gian phản ứng PSR với nhiệt độ tối ưu như trên cho ra kết quả khi đạt 50 phút là thời gian ngắn nhất để phản ứng khuếch đại đạt hiệu suất cao nhất. Qua đó chứng tỏ thời gian thực hiện phản ứng PSR trong nghiên cứu này ngắn hơn so với phương pháp nuôi cấy vi sinh truyền thống thường mất từ 4 – 5 ngày để cho ra kết quả cuối cùng.

Khảo sát giới hạn phát hiện tế bào vi khuẩn của phản ứng PSR cho thấy nồng độ tế bào thấp nhất mà phản ứng PSR có thể phát hiện được gen mục tiêu là 1 cfu/phản ứng, cho thấy phương pháp PSR có giới hạn phát hiện tế bào vi khuẩn thấp.

Phương pháp PSR phát hiện gen *spa* của *S. aureus* trong thực phẩm có nhiều ưu điểm như chỉ sử dụng một nhiệt độ cho phản ứng, thời gian có kết quả ngắn, quy trình thực hiện đơn giản, độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Qua nghiên cứu trên cho thấy cặp mồi được thiết kế để khuếch đại gen *spa* của *S. aureus* đạt hiệu quả cao. Quá trình khảo sát để tối ưu phản ứng PSR cho kết quả với nhiệt độ là 63°C trong thời gian 50 phút. Giới hạn phát hiện tế bào vi khuẩn của phản ứng PSR là 1 cfu/phản ứng. Kết quả phản ứng PSR trong thực phẩm so với kết quả phương pháp vi sinh có kết quả tương tự nhau. Qua đó cho thấy phương pháp PSR có độ tinh cậy cao.

Phương pháp PSR đã đáp ứng được những yêu cầu mà nghiên cứu đề ra về tính hiệu quả cao, kết quả khả thi và nhanh chóng với quy trình đơn giản mà không yêu cầu cao về thiết bị và nhân sự có chuyên môn. Từ đó có thể được ứng dụng nhiều hơn trong việc phát hiện nhanh tác nhân gây bệnh trong thực phẩm.

2. Kiến nghị

Nghiên cứu này chỉ đánh giá kết quả thực hiện trên quy mô phòng thí nghiệm. Vì vậy cần có thêm nhiều nghiên cứu khác thực hiện tại thực địa để đánh giá được khả năng của phương pháp PSR với mục đích tìm ra phương pháp kiểm tra đơn giản, nhanh chóng và cho ra kết quả có độ tin cậy cao.