

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

*****000*****

PHẠM TRẦN XUÂN HIỀN

**KHẢO SÁT ĐẬM ĐỘ VÀ KHẢ NĂNG SINH ĐỘC TỐ
CỦA VI KHUẨN *Staphylococcus aureus*
TRÊN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY**

**Luận văn kỹ sư
Chuyên Ngành: Công nghệ sinh học**

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 9/2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**KHẢO SÁT ĐẬM ĐỘ VÀ KHẢ NĂNG SINH ĐỘC TÓ
CỦA VI KHUẨN *Staphylococcus aureus*
TRÊN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY**

**Luận văn kỹ sư
Chuyên ngành: Công nghệ sinh học**

**Giáo viên hướng dẫn:
ThS. NGUYỄN ĐỖ PHÚC**

**Sinh viên thực hiện:
PHẠM TRẦN XUÂN HIỀN
Khóa: 2002-2006**

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 9/2006

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY, HCMC
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

**RELATIONSHIPS BETWEEN THE BACTERIA DENSITY
AND ABILITY PRODUCING STAPHYLOCOCCAL
ENTEROTOXIN (SEs) OF *Staphylococcus aureus*
IN TSGM AND BHI BROTH**

**Engineer Thesis
Major: Biotechnology**

Research adviser
NGUYỄN ĐỖ PHÚC, MSc

Researcher
PHẠM TRẦN XUÂN HIỀN
Term: 2002 - 2006

HCMC, 09/2006

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin gửi lòng biết ơn sâu sắc đến :

- * Ban giám hiệu trường Đại học Nông Lâm TP.HCM, Ban chủ nhiệm Bộ môn Công nghệ Sinh học, cùng tất cả Quý thầy cô đã truyền đạt kiến thức cho tôi trong suốt quá trình học tại trường.
- * ThS. Nguyễn Đỗ Phúc đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực tập và hoàn thành khóa luận tốt nghiệp này.
- * Ban Giám đốc Viện Vệ Sinh Y Tế Công Cộng TP. HCM đã tạo điều kiện cho tôi được thực tập tại Viện.
- * Các Anh Chị phòng Vi Sinh Thực Phẩm – khoa Dinh Dưỡng và Vệ Sinh An Toàn Thực Phẩm - Viện Vệ Sinh Y Tế Công Cộng TP. HCM đã hết lòng giúp đỡ tôi trong thời gian thực tập.
- * Các bạn lớp CNSH28 đã giúp đỡ, chia sẻ cùng tôi trong suốt 4 năm học.
- * Gia đình và bạn bè đã ủng hộ, động viên tôi học tập và hoàn thành khóa luận tốt nghiệp.

Sinh viên thực hiện

Phạm Trần Xuân Hiền

TÓM TẮT KHÓA LUẬN

PHẠM TRẦN XUÂN HIỀN, Đại học Nông Lâm TP.Hồ Chí Minh. Tháng 9/2006. “KHẢO SÁT ĐẬM ĐỘ VÀ KHẢ NĂNG SINH ĐỘC TỔ CỦA VI KHUẨN *Staphylococcus aureus* TRÊN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY”

Giáo viên hướng dẫn:

ThS. NGUYỄN ĐỖ PHÚC

Staphylococcus aureus là cầu khuẩn gram dương có khả năng tạo độc tố ruột enterotoxin là một trong những nguyên nhân chính gây ngộ độc thực phẩm. Hiện nay, trong kiểm nghiệm thực phẩm và tìm nguyên nhân của các vụ ngộ độc do tụ cầu chỉ xác định sự có mặt của vi khuẩn này trong thực phẩm, chưa tiến hành kiểm tra độc tố ruột mà đây là nguyên nhân chính dẫn đến ngộ độc. Vì thế, để tìm hiểu khả năng sinh độc tố của *S. aureus*, chúng tôi tiến hành khảo sát đậm độ và khả năng sinh độc tố của *S. aureus* trên môi trường nuôi cấy, nhằm góp phần thiết thực trong công tác kiểm nghiệm thực phẩm, đặc biệt là các vụ ngộ độc do độc tố ruột của tụ cầu *S. aureus* gây ra. Các chủng *S. aureus* được nuôi cấy trên hai môi trường TSGM (Tecra Staphylococcal Growth Medium) và BHI (Brain Heart Infusion); sau đó khảo sát đậm độ, đồng thời tách chiết và thử nghiệm độc tố bằng phương pháp ELISA với bộ kit TECRA ở các thời điểm 16, 24, 48 và 72 giờ.

Kết quả thu được như sau:

- ◆ Trong 36 chủng *S. aureus* khảo sát, có 10 chủng có khả năng tạo độc tố (chiếm 27,8%), trong đó các chủng từ mẫu bệnh phẩm chiếm tỉ lệ cao nhất (50%).
- ◆ Đậm độ và độc tố *S. aureus* không tương quan với nhau; độc tố tăng theo thời gian và cao nhất ở 72 giờ. Sau 16 giờ nuôi cấy, trên môi trường TSGM, đậm độ vi khuẩn đạt 7,86 log₁₀ cfu/ml thì độc tố đạt giá trị OD (ELISA) là 1,464. Trên môi trường BHI, đậm độ vi khuẩn đạt 8,13 log₁₀ cfu/ml thì độc tố đạt giá trị OD (ELISA) là 1,437 (OD ≥ 0,2 là dương tính).
- ◆ Hai môi trường TSGM và BHI là như nhau về ảnh hưởng đến đậm độ và khả năng tạo độc tố của *S. aureus*.
- ◆ Các chủng *S. aureus* này tạo các loại độc tố SEA, SEB, SEC. Trong đó, SEA chiếm 80%, trong khi SEB là 10% và SEC 10%.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a Gram-positive coccus having ability to produce enterotoxin. It is responsible for one of the most common types of food poisoning. In testing food and finding the reason causing food poisoning nowadays, we have mainly tested the presence of *S. aureus*, not enterotoxin which is the primary causative agent of Staphylococcal food poisoning. Therefore, in order to get information of producing enterotoxin, we carry on examining *S. aureus* growth and its ability to produce enterotoxin in culture medium that contributes practically in testing food, especially in Staphylococcal food poisoning outbreaks. *S. aureus* strains are cultured in TSGM and BHI medium; then we examine their growth and test SE by ELISA method with TECRA kit after 16, 24, 48 and 72 hours.

The results we find:

- ◆ Among 36 strains surveyed, there are ten ones having ability to produce SE (27,8%). In these ten strains, the ones from clinical samples have the highest rate (50%).
- ◆ *S. aureus* growth and SE amount are not correlative. SE amount increases with time. After 16 hours culture, on TSGM, as the cell concentration reaches 7,86 log₁₀ cfu/ml, OD ELISA value is 1,464; on BHI, as the cell concentration reaches 8,13 log₁₀ cfu/ml OD, ELISA value is 1,437 (OD ≥ 0,2 is positive).
- ◆ TSGM and BHI medium are the same influence for *S. aureus* growth and ability to produce enterotoxin.
- ◆ These *S. aureus* strains produce SEA, SEB, SEC. Among them, the rate of SEA is 80%, of SEB is 10% and of SEC is 10%.

MỤC LỤC

ĐỀ MỤC	TRANG
Trang tựa	
Lời cảm tạ.....	iii
Tóm tắt.....	iv
Abstract.....	v
Mục lục.....	vi
Danh sách các chữ viết tắt.....	ix
Danh sách các bảng.....	x
Danh sách các hình.....	xi
1. MỞ ĐẦU	
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục đích.....	1
1.3. Yêu cầu.....	2
2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	
2.1. Giới thiệu về <i>Staphylococcus</i>	3
2.1.1. Hình thái.....	3
2.1.2. Tính chất.....	3
2.1.3. Phân loại.....	4
2.2. Giới thiệu về <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.2.1. Hình thái, đặc điểm sinh hóa.....	4
2.2.2. Điều kiện tăng trưởng và sự phân bố.....	6
2.2.3. Tính kháng thuốc kháng sinh.....	7
2.2.4. Sự sinh trưởng của <i>S. aureus</i>	8
2.3. Ngộ độc thực phẩm do <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.3.1. Những triệu chứng thường gặp.....	8
2.3.2. Tình hình ngộ độc do <i>S. aureus</i>	9
2.4. Phương pháp phát hiện <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.4.1. Phương pháp truyền thống.....	11
2.4.1.1. Phương pháp định tính.....	11

2.4.1.2. Phương pháp định lượng.....	12
2.4.2. Phương pháp hiện đại	13
2.5. Các yếu tố độc lực của <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.5.1. Protein bề mặt	14
2.5.2. Yếu tố xâm lấn.....	14
2.5.3. Các yếu tố chống lại sự tự vệ của tế bào chủ.....	16
2.6. Độc tố ruột enterotoxin của <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.6.1. Cấu trúc.....	18
2.6.2. Phân loại	18
2.6.3. Tính chất	19
2.6.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển và việc tạo độc tố SE của tụ cầu.....	19
2.6.5. Những hoạt tính của độc tố SE	20
2.6.5.1. Hoạt tính siêu kháng nguyên	20
2.6.5.2. Hoạt tính gây nôn.....	21
2.6.6. Phương pháp phát hiện độc tố SE.....	22
2.6.6.1. Phương pháp khuếch tán trên gel.....	22
2.6.6.2. Phương pháp miễn dịch phóng xạ - RIA	22
2.6.6.3. Phương pháp RPLA	23
2.6.6.4. Phương pháp PCR.....	23
2.6.6.5. Phương pháp ELISA	24

3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH

3.1. Thời gian và địa điểm	26
3.1.1. Thời gian thực hiện đề tài	26
3.1.2. Địa điểm thực hiện.....	26
3.2. Vật liệu.....	26
3.2.1. Chủng <i>S. aureus</i>	26
3.2.2. Thiết bị và dụng cụ	26
3.2.3. Hóa chất	26
3.3. Phương pháp	27
3.3.1. Bố trí thí nghiệm.....	27
3.3.2. Qui trình thí nghiệm.....	27

3.3.2.1. Tuyền chọn các chủng <i>S. aureus</i>	27
3.3.2.2. Khảo sát đậm độ vi khuẩn theo thời gian	29
3.3.2.3. Xác định độc tố ruột enterotoxin bằng kĩ thuật ELISA	30
4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	
4.1. Kiểm tra độ sống và độ thuần của các chủng <i>S. aureus</i>	36
4.2. Khảo sát đậm độ và khả năng sinh độc tố của các chủng <i>S. aureus</i>	39
4.2.1. Đậm độ.....	39
4.2.1.1. Trên môi trường TSGM	39
4.2.1.2. Trên môi trường BHI.....	40
4.2.2. Khả năng sinh độc tố	42
4.3. Khảo sát các chủng có khả năng sinh độc tố	44
4.3.1. Tương quan giữ đậm độ và khả năng tạo độc tố	44
4.3.2. Đánh giá tác động của hai môi trường TSGM và BHI.....	47
4.4. Xác định các loại độc tố SE	47
5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	
5.1. Kết luận.....	50
5.2. Đề nghị.....	50
6. TÀI LIỆU THAM KHẢO	51
PHỤ LỤC.....	56

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

BHI	:	Brain Heart Infusion
BP	:	Baird Parker
cfu	:	colony form unit
EIA	:	Enzyme Immunoassay
ELISA	:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAME	:	Fatty Acid Modifying Enzyme
KL	:	khuẩn lạc
MSA	:	Manitol salt agar
MPN	:	Most Probable Number Method
MRSA	:	Methicilin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
pNPP	:	p-nitrophenyl photphatase
RIA	:	Radio Immunoassay
RFLP	:	Randomly Fragment Length Polymorphism
RLPD	:	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RPLA	:	Reversed Passive Latex Agglutination
<i>S. aureus</i>	:	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	:	Staphylococcal enterotoxin
<i>S. epidermidis</i>	:	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
TSA	:	Tryptic soy agar
TSB	:	Tryptic Soy Broth
TSGM	:	Tecra Staphylococcal Growth Medium
TSST-1	:	Toxic shock syndrom toxin
VRSA	:	Vancomycin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
(+)	:	dương tính
(-)	:	âm tính

DANH SÁCH CÁC BẢNG

BẢNG	TRANG
Bảng 2.1. Những đặc tính của <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> và Micrococci	6
Bảng 4.1: Nguồn gốc và kết quả kiểm tra các chủng <i>S. aureus</i>	36
Bảng 4.2. Tỷ lệ nguồn gốc các chủng <i>S. aureus</i>	37
Bảng 4.3. Độ đậm độ và khả năng sinh độc tố của <i>S. aureus</i> trên môi trường TSGM	39
Bảng 4.4. Độ đậm độ và khả năng sinh độc tố của <i>S. aureus</i> trên môi trường BHI.....	41
Bảng 4.5. Giá trị OD của đôi chứng âm và đôi chứng dương.....	42
Bảng 4.6. Nguồn gốc các chủng <i>S. aureus</i> cho độc tố dương tính.....	44
Bảng 4.7. Các chủng <i>S. aureus</i> có khả năng tạo độc tố trên môi trường TSGM	44
Bảng 4.8. Các chủng <i>S. aureus</i> có khả năng tạo độc tố trên môi trường BHI	45
Bảng 4.9. Các loại độc tố của các chủng <i>S. aureus</i>	48

DANH SÁCH CÁC HÌNH

HÌNH	TRANG
Hình 2.1. Hình thái <i>Staphylococcus aureus</i>	4
Hình 2.2. Tụ cầu <i>Staphylococcus aureus</i> gram dương dưới kính hiển vi	5
Hình 2.3. Các yếu tố độc lực của <i>Staphylococcus aureus</i>	14
Hình 2.4 Vị trí nhiễm và gây bệnh ở người của <i>S. aureus</i>	17
Hình 2.5. Hoạt tính siêu kháng nguyên	21
Hình 3.1. Kết quả phản ứng coagulase.....	29
Hình 3.2. Bộ kit Tecra xác định SE (SETVIA96).....	35
Hình 3.3. Bộ kit Tecra phân loại SE (SIDVIA72)	35
Hình 4.1. Khuẩn lạc <i>S. aureus</i> trên môi trường Baird Paker.....	38
Hình 4.2. Khuẩn lạc <i>S. aureus</i> trên môi trường MSA.....	38
Hình 4.3. Nguồn gốc các chủng <i>S. aureus</i>	38
Hình 4.4. Biểu đồ về sự phát triển của <i>S. aureus</i> trên môi trường TSGM.....	40
Hình 4.5. Biểu đồ về sự phát triển của <i>S. aureus</i> trên môi trường BHI	42
Hình 4.6. Phản ứng ELISA xác định độc tố ruột enterotoxin	43
Hình 4.7. Biểu đồ về đậm độ và khả năng sinh độc tố trên môi trường TSGM	46
Hình 4.8. Biểu đồ về đậm độ và khả năng sinh độc tố trên môi trường BHI.....	46
Hình 4.9. Kết quả xác định loại độc tố bằng phương pháp ELISA.....	48
Hình 4.10. Tỷ lệ các loại độc tố SE.....	49

PHẦN 1. MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Hiện nay, vấn đề vệ sinh an toàn thực phẩm ngày càng được quan tâm. Tuy nhiên, gần đây ở nước ta và nhiều nước trên thế giới vẫn thường xảy ra những vụ ngộ độc thực phẩm tại các bếp ăn tập thể ở các nhà máy, xí nghiệp, trường học,... Theo WHO/FAO (tháng 5/2005), ngộ độc thực phẩm xảy ra ở nhiều nơi, ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe con người và kinh tế. Trong đó, hầu hết các vụ ngộ độc cấp tính đều do *Staphylococcus aureus* gây ra. *S. aureus* là vi khuẩn hình cầu, gram dương, phân bố rải rác trong tự nhiên, nhưng chủ yếu được phân lập từ da, tóc, màng nhày, mũi của người và động vật máu nóng. *S. aureus* sinh ra một số loại độc tố ruột enterotoxin bền nhiệt, không bị phân hủy khi đun ở 100°C trong khoảng 30 phút. Khi xâm nhiễm vào thực phẩm, *S. aureus* tiết độc tố ruột và gây độc. Sau 3-6 giờ ủ bệnh người tiêu thụ thực phẩm sẽ bộc phát các triệu chứng lâm sàng như nôn mửa, đau bụng, tiêu chảy... các triệu chứng này có thể kéo dài từ 6-8 giờ, nhiều trường hợp phải nhập viện do mất nhiều nước.

Việc chẩn đoán tìm nguyên nhân ngộ độc trong các vụ ngộ độc thực phẩm hiện nay chỉ xác định sự có mặt của vi khuẩn này trong thực phẩm, chưa tiến hành kiểm tra độc tố ruột enterotoxin mà đây là nguyên nhân chính dẫn đến ngộ độc. Để tìm hiểu khả năng sinh độc tố của *S. aureus*, chúng tôi tiến hành khảo sát đậm độ và khả năng sinh độc tố của chúng trên môi trường nuôi cấy, nhằm góp phần thiết thực trong công tác kiểm nghiệm thực phẩm, đặc biệt là các vụ ngộ độc do độc tố ruột của tụ cầu *S. aureus* gây ra.

Chính vì thế, được sự chấp thuận của bộ môn Công Nghệ Sinh Học và Viện Vệ Sinh Y Tế Công Cộng TP. HCM, chúng tôi tiến hành đề tài “**Khảo sát đậm độ và khả năng sinh độc tố của vi khuẩn *S. aureus* trên môi trường nuôi cấy**”.

1.2. Mục đích

- ◆ Khảo sát đậm độ và khả năng sinh độc tố của vi khuẩn *S. aureus* trên môi trường nuôi cấy ở các khoảng thời gian khác nhau.
- ◆ Xác định khả năng sinh độc tố của các chủng khảo sát và tỉ lệ các loại độc tố.

1.3. Nội dung nghiên cứu

- Nuôi cấy các chủng *S. aureus* trên hai môi trường TSGM và BHI.
- Kiểm tra đậm độ và độc tố ruột của các chủng *S. aureus* trên hai loại môi trường TSGM và BHI vào thời điểm 16, 24, 48 và 72 giờ bằng kỹ thuật ELISA (sử dụng bộ kit TECRA – Australia).
- Xác định mối tương quan giữa đậm độ và khả năng sinh độc tố của *S. aureus*.
- Xác định các loại độc tố enterotoxin.

PHẦN 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Giới thiệu về *Staphylococcus*:

Staphylococcus có nguồn gốc từ tiếng Latinh, *staphylo* (chùm nho) và *coccus* (hạt).

Phân loại của vi khuẩn *Staphylococcus* như sau:

- Giới: Prokaryote
- Phân loại: Firmicute
- Lớp: Firmibacteria
- Họ: Micrococceae
- Giống: *Staphylococcus*

2.1.1. Hình thái

Staphylococcus là vi khuẩn gram dương, hình cầu đường kính 0,5 - 1,5 μm , có thể đứng riêng lẻ, từng đôi, từng chuỗi ngắn, hoặc từng chùm không đều giống như chùm nho. Đây là loại vi khuẩn không di động và không sinh bào tử, thường cư trú trên da và màng nhày của người và động vật máu nóng. Năm 1871, Recklinghausen thu được cầu khuẩn trong thận của bệnh nhân chết do bệnh nhiễm khuẩn huyết. Năm 1880, Alexander Ogston chứng minh được áp-xe sinh mủ là do cầu khuẩn dạng chùm và Ogston được công nhận là người khám phá và đặt tên cho tụ cầu – *Staphylococcus* vào năm 1882. Năm 1884, Rosenbach nghiên cứu và đặt tên cho cầu khuẩn tạo khuẩn lạc màu vàng là *Staphylococcus pyrogen aureus* (Scott E Martin và John J Iandolo, 2000).

2.1.2. Tính chất

Staphylococcus là những vi khuẩn hiếu khí hoặc kỵ khí tùy nghi, có cả sự trao đổi chất, hô hấp và lên men. Chúng cho phản ứng catalase dương tính và có thể sử dụng nhiều loại carbonhidrat khác nhau tạo acid lactic nhưng không sinh hơi. Khuẩn lạc trên môi trường không chọn lọc như Tryptic soy agar thường từ màu kem đến màu cam. Thành tế bào chứa peptidoglican hình thành một hàng rào cứng vững chắc xung quanh tế bào và acid teichoic giúp duy trì môi trường ion thích hợp cho màng cytoplasma, đồng thời góp phần bảo vệ bề mặt tế bào tụ cầu. *Staphylococcus* có thể mọc ở nhiều điều kiện, môi trường khác nhau, nhưng tốt nhất ở nhiệt độ từ 30-37°C và

pH gần trung tính. Chúng kháng được với các chất diệt trùng, độ khô nóng và có khả năng tăng trưởng trong môi trường chứa đến 15% NaCl (Scott E Martin và John J Iandolo, 2000).

2.1.3. Phân loại

Hiện nay người ta đã biết được 33 loài *Staphylococcus* (Mary K. Sandel và John L. McKillip, 2002) nhưng có một số loài ít được quan tâm. Có thể chia *Staphylococcus* thành 3 nhóm:

- Nhóm cho phản ứng coagulase dương tính.
- Nhóm cho phản ứng coagulase âm tính và nhạy với Nobovicine.
- Nhóm cho phản ứng coagulase âm tính và kháng với Nobovicine.

Trong số các loài *Staphylococcus* thì *Staphylococcus aureus* là loài thường gặp nhất, chúng thuộc nhóm cho phản ứng coagulase dương tính.

2.2. Giới thiệu về *Staphylococcus aureus*

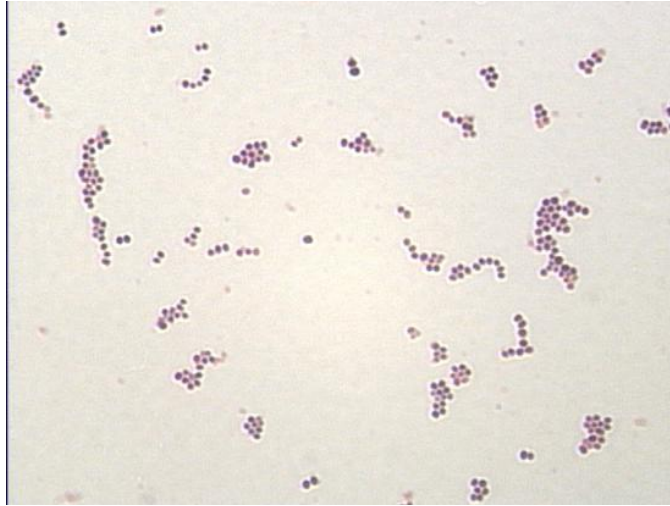
2.2.1. Hình thái, đặc điểm sinh hóa

Staphylococcus aureus thuộc giống *Staphylococcus*, do đó mang những tính chất chung của *staphylococcus*. *S. aureus* là những vi khuẩn hình cầu, không di động, gram dương, đường kính 0,5-1,5 μm , tế bào xếp thành hình chùm nho, không di động. Thành tế bào kháng với lysozyme và nhạy với lysotaphin, một chất có thể phá hủy cầu nối pentaglycin của tụ cầu (J Harvey và A Gilmour, 2000).



Hình 2.1. Hình thái *Staphylococcus aureus*

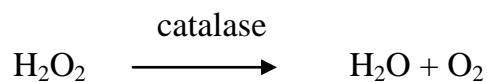
(Nguồn: Theo <www.biotox.cz/.../staphylococcus_aureus_1s.jpg>)



Hình 2.2. Tụ cầu *Staphylococcus aureus* gram dương dưới kính hiển vi

(Nguồn: Theo <<http://www.mgm.ufl.edu/%7Egulg/mmid/mmid%2Dlab/labimage/imagky.html>>)

S. aureus là những vi khuẩn hiếu khí hay kỵ khí tùy nghi, có enzyme catalase phân giải oxy già giải phóng oxy và nước:



S. aureus cho phản ứng đông huyết tương dương tính do chúng tiết ra enzyme coagulase. Đây được xem là tính chất đặc trưng của *S. aureus*, là tiêu chuẩn để phân biệt *S. aureus* với các tụ cầu khác. Có hai dạng coagulase: coagulase “cố định” (“bound” coagulase) gắn vào thành tế bào và coagulase “tự do” (“free” coagulase) được phóng thích khỏi thành tế bào. Có hai phương pháp để thực hiện thử nghiệm coagulase là thực hiện trên lam kính và trong ống nghiệm. Phương pháp lam kính giúp phát hiện những coagulase “cố định” bằng cách phản ứng trực tiếp với fibrinogen, phương pháp ống nghiệm phát hiện những coagulase “tự do” bằng phản ứng gián tiếp với fibrinogen qua cộng hợp với những yếu tố khác trong huyết tương (C H Collin và ctv, 1995).

Ngoài ra, chúng còn cho phản ứng DNase, phosphatase dương tính, có khả năng lên men và sinh acid từ manitol, trehalose, sucrose. Tất cả các dòng *S. aureus* đều nhạy với Novobicine, có khả năng tăng trưởng trong môi trường chứa đến 15% muối NaCl (Trần Linh Thuộc, 2002).

Một số dòng *S. aureus* có khả năng gây tan máu trên môi trường thạch máu, vòng tan máu phụ thuộc vào từng chủng nhưng chúng đều có vòng tan máu hẹp hơn so

với đường kính khuẩn lạc. Hầu hết các dòng *S. aureus* đều tạo sắc tố vàng, nhưng các sắc tố này ít thấy khi quá trình nuôi cấy còn non mà thường thấy rõ sau 1-2 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ phòng. Sắc tố được tạo ra nhiều hơn trong môi trường có hiện diện lactose hay các nguồn hydrocacbon khác mà vi sinh vật này có thể bẻ gãy và sử dụng (C H Collin và ctv, 1995).

Trên môi trường BP (Baird Parker), khuẩn lạc đặc trưng của *S. aureus* có màu đen nhánh, bóng, lồi, đường kính 1-1,5 mm, quanh khuẩn lạc có vòng sáng rộng 2-5 mm (do khả năng khử potassium tellurite K_2TeO_3 và khả năng thủy phân lòng đỏ trứng của leithinase) (Rosamund M Baird và W.H.Lee, 1995; Mary K. Sandel và John L. McKillip, 2002). Trên môi trường MSA (Manitol salt agar) hay còn gọi là môi trường Chapman, khuẩn lạc tròn, bờ đều và lồi, màu vàng nhạt đến vàng đậm và làm vàng môi trường xung quanh khuẩn lạc (do lên men đường manitol) (Mary K. Sandel và John L. McKillip, 2002).

Đa số các dòng *S. aureus* có thể tổng hợp một hay nhiều enterotoxin trong môi trường có nhiệt độ trên 15°C, nhiều nhất khi chúng tăng trưởng ở nhiệt độ 35-37°C (Trần Linh Thuộc, 2002)

Bảng 2.1. Những đặc tính của *S. aureus*, *S. epidermidis* và Micrococci

(Nguồn: Theo Reginald W. Bennett và Gayle A. Lancette, 2001)

Đặc tính	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	Micrococci
Catalase	+	+	+
Coagulase	+	-	-
Thermonuclease	+	-	-
Nhạy với Lysostaphin	+	+	-
Sử dụng glucose	+	+	-
Sử dụng manitol	+	-	-

2.2.2. Điều kiện tăng trưởng và sự phân bố

Nhu cầu dinh dưỡng cho sự phát triển của *Staphylococcus aureus* thay đổi tùy thuộc vào từng dòng (P J Bremer và ctv, 2004). *S. aureus* có khả năng phát triển trong khoảng nhiệt độ rất rộng, từ 7-48°C, với nhiệt độ cực thuận là 30-45°C; khoảng pH 4,2-9,3, với độ pH cực thuận là 7-7,5; và trong môi trường chứa trên 15% NaCl (J

Harvey và A Gilmour, 2000). Tụ cầu bền vững khi có nồng độ đường cao, nhưng bị ức chế bởi nồng độ 60%; nồng độ từ 33 - 55%, tụ cầu vẫn phát triển, trong khi các vi khuẩn khác như *Shigella* và *Salmonella* bị ức chế (Đỗ Thị Hòa, 2006). Ngoài ra, chúng còn có khả năng bám dính tốt trên nhiều loại tế bào và máy móc thiết bị giúp gia tăng tính kháng của tụ cầu với sự sấy khô và lọc thấm. Chính nhờ những đặc điểm trên giúp *S. aureus* có sự phân bố rộng, chủ yếu được phân lập từ da, màng nhày, tóc và mũi của người và động vật máu nóng. *S. aureus* được cho là vi khuẩn khá mạnh có thể sống tốt bên ngoài kí chủ. Vi khuẩn này còn có mặt trong không khí, bụi và trong nước dù chúng thiếu tính di động và rất nhạy với thuốc kháng sinh và chất diệt khuẩn (J Harvey và A Gilmour, 2000). Tuy nhiên, *S. aureus* cũng khá nhạy với nhiệt độ, bị diệt ở 60°C từ 2-50 phút tùy từng loại thực phẩm và là vi sinh vật cạnh tranh yếu, dễ bị các vi sinh vật khác ức chế (P J Bremer và ctv, 2004).

Có 10 - 50% dân số vẫn sống khỏe mạnh dù mang *S. aureus* (P J Bremer và ctv, 2004). Tuy nhiên khả năng nhiễm vào thực phẩm và gây bệnh của *S. aureus* cũng rất lớn do chúng phân bố ở khắp nơi và có khả năng sinh độc tố. Tụ cầu nhiễm thực phẩm vào chủ yếu qua con đường chế biến có các công đoạn tiếp xúc trực tiếp với người. Sự hiện diện với mật độ cao của *S. aureus* trong thực phẩm cho thấy điều kiện vệ sinh của quá trình chế biến kém, kiểm soát nhiệt độ trong các công đoạn chế biến không tốt. Tuy nhiên, điều đó không đủ bằng chứng để cho rằng thực phẩm đó sẽ gây độc, điều đó chỉ xảy ra khi *S. aureus* được phân lập tạo độc tố. Ngược lại, chỉ với một lượng nhỏ *S. aureus* tạo độc tố cũng có thể gây ngộ độc (Reginald W. Bennett và Gayle A. Lancette, 2001).

2.2.3. Tính kháng thuốc kháng sinh

Hầu hết các dòng *S. aureus* kháng với nhiều loại kháng sinh khác nhau. Một vài dòng kháng với tất cả các loại kháng sinh ngoại trừ vancomycin, và những dòng này ngày càng tăng. Những dòng MRSA (Methicilin resistant *Staphylococcus aureus*) rất phổ biến và hầu hết các dòng này cũng kháng với nhiều kháng sinh khác. Trong phòng thí nghiệm, người ta đã tìm thấy plasmid kháng vancomycin ở *Enterococcus faecalis* có thể chuyển sang *S. aureus*, và người ta nghĩ rằng việc chuyển này có thể xảy ra ngoài tự nhiên, trong đường tiêu hóa chẳng hạn. Ngoài ra, *S. aureus* còn kháng với chất khử trùng và chất tẩy uế (Kenneth Todar, 2005).

Từ khi sử dụng penicillin vào những năm 1940, tính kháng thuốc đã hình thành ở tụ cầu trong thời gian rất ngắn. Nhiều dòng hiện nay đã kháng với hầu hết kháng sinh thông thường, và sắp tới sẽ kháng cả những kháng sinh mới. Thật sự là trong hai năm gần đây, việc thay thế kháng sinh cũ bằng vancomycin đã dẫn đến sự gia tăng các dòng kháng vancomycin VRSA (Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*) (Kenneth Todar , 2005).

2.2.4. Sự sinh trưởng của *S. aureus*

Cũng như các vi sinh vật khác, sự phát triển của *S. aureus* được nghiên cứu bằng cách phân tích đường cong sinh trưởng của chúng. Đường cong tăng trưởng chia làm 4 giai đoạn:

- **Phase chậm:** Các tế bào không phân chia do đó không có sự gia tăng về số lượng nhưng các thành phần bên trong tế bào vẫn được tổng hợp.
- **Phase tăng trưởng cấp số:** Vi sinh vật phát triển và phân chia ở tốc độ cực đại. Dưới những điều kiện bình thường thì tốc độ tăng trưởng ở giai đoạn này không thay đổi. Khi đó, các vật liệu tế bào được tổng hợp cũng với tỉ lệ không đổi nhưng các vật liệu mới này sẽ tự phân giải và số lượng tế bào tăng theo số mũ (Ernest Jawetz, 1989).
- **Phase dừng:** Sự tăng trưởng dừng lại. Tỉ lệ tế bào phân chia bằng với tỉ lệ tế bào chết, vì thế số lượng tế bào không thay đổi (Stephen T Apedon, 1998).
- **Phase suy vong (phase chết):** Tỉ lệ tế bào chết gia tăng nên tỉ lệ tế bào chết cao hơn tỉ lệ tế bào phân chia, do đó số lượng tế bào giảm.

2.3. Ngộ độc thực phẩm do *Staphylococcus aureus*

2.3.1. Những triệu chứng thường gặp

Staphylococcus aureus được xem là một trong ba tác nhân chính của các vụ ngộ độc thực phẩm ở nhiều nước chỉ sau *Salmonella* và *Clostridium perfringens* (J.P.Rosec và ctv, 1996; J.M. Fueyo và ctv, 2000; Viktoria Atanassova và ctv, 2001; P J Bremer và ctv, 2004; G.Normanno và ctv, 2005). Triệu chứng thường gặp ở các vụ ngộ độc do tụ cầu là buồn nôn, nôn mửa, đau bụng, có hay không có tiêu chảy, ngoài ra còn có thể bị đau đầu, chuột rút, thay đổi huyết áp. Triệu chứng ngộ độc xảy ra nhanh, từ 3-6 giờ sau khi ăn thực phẩm bị nhiễm, tùy vào lượng thực phẩm đã dùng, lượng độc tố có trong thực phẩm và độ nhạy với độc tố cũng như sức khỏe của từng người (P J Bremer và ctv, 2004). Thường thì các triệu chứng chỉ kéo dài trong một

thời gian ngắn, khoảng 6-8 giờ (Trần Linh Thước, 2002) và hết bệnh sau 1-2 ngày (P J Bremer và ctv, 2004). Tuy nhiên khoảng 10% trường hợp người bệnh bị mất nhiều nước cần phải nhập viện để truyền dịch (G. Normanno và ctv, 2004).

Những thực phẩm bị nhiễm tụ cầu và gây ngộ độc thường gặp là thịt, cá, gà và sản phẩm từ chúng, rau cải, trứng, nấm, sữa và sản phẩm từ sữa, kem, phomai, thực phẩm lên men... (G. Normanno và ctv, 2004).

Hầu hết các vụ ngộ độc do tụ cầu là do quá trình chế biến hoặc bảo quản thực phẩm không tốt. Tụ cầu thường nhiễm trực tiếp vào thực phẩm do tay người chế biến bị trầy xước hay do ho, hắt hơi. Việc bảo quản thực phẩm ở nhiệt độ không phù hợp cũng rất quan trọng, một khi thực phẩm đã nhiễm tụ cầu, chúng sẽ tăng nhanh số lượng do tụ cầu phát triển được trong khoảng nhiệt độ rất lớn, từ 7-48°C. Điều đáng lo ngại độc tố được tạo ra trong suốt quá trình phát triển của tụ cầu nhưng lại không gây ảnh hưởng đến cảm quan của thực phẩm, do đó ít được chú ý (Mary K. Sandel và John L. McKillip, 2002).

2.3.2. Tình hình ngộ độc do *Staphylococcus aureus*

Tuy thời gian gây bệnh ngắn nhưng những vụ ngộ độc thực phẩm do tụ cầu để lại hậu quả không nhỏ. Theo đánh giá của tổ chức Y tế thế giới, hàng năm Việt nam có khoảng trên 3 triệu ca ngộ độc thực phẩm, gây tổn hại trên 200 triệu USD. Trong những năm gần đây số vụ ngộ độc thực phẩm ở nước ta ngày càng gia tăng. Năm 2000 có 213 vụ ngộ độc thực phẩm với 4233 người mắc 59 người tử vong (Bùi Thế Hiền, Tô Thị Thu và cộng sự, 2003).

Theo số liệu từ Cục Quản lý chất lượng vệ sinh an toàn thực phẩm, trong những vụ dịch được tổng kết từ năm 1997 đến 2002 thì ngộ độc thực phẩm do tác nhân vi sinh vật chiếm tỷ lệ cao từ 40-45% trong các loại gây ngộ độc, trong số đó có nhiều vụ được xác định tác nhân là *Staphylococcus aureus* (Nguyễn Đỗ Phúc và ctv, 2003).

Từ năm 2002 đến 2004 theo số liệu của trung tâm y tế dự phòng đã có 77 vụ ngộ độc thực phẩm mà phần lớn nguyên nhân là do thức ăn bị nhiễm khuẩn, chiếm 66% (Nguyễn Lý Hương và ctv, 2005).

Từ dữ liệu của Cục vệ sinh an toàn thực phẩm thì năm 2005 số vụ ngộ độc thực phẩm ở nước ta là 141 vụ, làm 4291 người bị ngộ độc, trong đó có 73 vụ (51,8%) là do vi sinh vật gây ra. Từ tháng 1/2006 đến tháng 3/2006, có 18 vụ ngộ độc thực phẩm, trong đó vi sinh vật gây ra 5 vụ (27,8%).

Qua các cuộc khảo sát tình hình vệ sinh thức ăn đường phố và các thực phẩm chế biến sẵn tại các chợ cho thấy mức độ nhiễm *Staphylococcus aureus* là rất cao, phù hợp với các kết quả xét nghiệm trong các vụ ngộ độc tại thành phố Hồ Chí Minh trong những năm qua. Đáng chú ý hơn cả là ở các mẫu bánh mì thịt nguội là 16/30 mẫu (53%), các mẫu thịt quay là 18/20 mẫu (90%) (Nguyễn Đỗ Phúc và ctv, 2003; Nguyễn Lý Hương và ctv, 2005).

Đáng chú ý hơn cả là vụ ngộ độc thực phẩm của cán bộ, sinh viên khoa Địa chất và Sinh học trường Đại học Khoa học tự nhiên TP.HCM vào ngày 27/7/2006 trong chuyến đi thực tế và đã ăn trưa tại Nha Trang (Khánh Hòa). Ba giờ chiều cùng ngày, nhiều cán bộ sinh viên đau đầu, tiêu chảy, ói mửa, tất cả 105 người phải vào bệnh viện để cấp cứu. Nguyên nhân được xác định là do thức ăn chế biến không hợp vệ sinh, lại để lâu nên đã nhiễm tụ cầu trùng vàng và đã sinh độc tố enterotoxin. Enterotoxin do tụ cầu tạo ra là loại độc tố cực mạnh gây ngộ độc cấp tính. Mấy năm gần đây, những vụ ngộ độc thức ăn do tụ cầu được phát hiện và nói đến nhiều hơn (Đỗ Thị Hòa, 2006).

Ngộ độc thực phẩm không chỉ xảy ra ở nước ta mà còn xảy ra ở nhiều nước trên thế giới kể cả những nước phát triển. Theo WHO/FAO (tháng 5/2005), ngộ độc thực phẩm ảnh hưởng rất lớn đến sức khỏe con người và kinh tế, làm 1,5 tỉ lượt người bệnh (Nguyễn Văn Hải và Lê Trung Hải, 2005).

Ở Mỹ, tụ cầu gây ra khoảng 14% trong các vụ ngộ độc thực phẩm; và hàng năm, Mỹ mất khoảng 1,5 tỉ đô la cho những vụ ngộ độc do tụ cầu (G.Normanno và ctv, 2005). Ngoài vấn đề viện phí còn phải mất nhiều thời gian làm việc cũng như sản phẩm lao động của người bệnh, và cả việc phải loại bỏ những sản phẩm bị nhiễm...

Vụ ngộ độc lớn đầu tiên có liên quan đến tụ cầu xảy ra vào năm 1884 ở Michigan do phomai. Tiếp đến là ở Pháp vào năm 1894 do thịt từ bò bị bệnh. Khô bò bị nhiễm tụ cầu cũng từng gây ngộ độc ở Kalamazoo, Michigan vào năm 1907. Năm 1914, ở Philippines, Barbert xác định rằng sữa lấy từ bò bị viêm vú đã gây ra ngộ độc ở người. Năm 1930, Dark lại xác định được vụ ngộ độc do *S. aureus* từ bánh giáng sinh. (Sita R Tatini và Reginald Bennett, 2000).

Cách đây vài thập niên, các vụ ngộ độc do tụ cầu chiếm 25% các vụ ngộ độc thực phẩm ở Mỹ (G. Normanno và ctv, 2004). Từ năm 1988 đến 1992, *S. aureus* gây ra 5,1% trong số các vụ ngộ độc ở Châu Âu (G.Normanno và ctv, 2005). Từ năm 1988

đến 1996, ở Đức xảy ra nhiều vụ ngộ độc thực phẩm do tụ cầu gây ra và vào năm 2000 lại xảy ra một vụ dịch làm 297 người bị ngộ độc cũng do tác nhân là tụ cầu (Viktoria Atanassova và ctv, 2001).

Ở Đài Loan, *S. aureus* chiếm 30% trong số các vụ dịch từ năm 1986 đến năm 1995, Vào tháng 6 năm 2000, vụ ngộ độc thực phẩm do tụ cầu tại một trường trung học ở Taichung County làm 10 trong số 356 học sinh có biểu hiện ngộ độc 2-3 giờ sau khi ăn sáng (H.-L. Wei và C.-S. Chiou, 2002) . Tại Brazil, vào tháng 2 và tháng 5 năm 1999 đã xảy ra hai vụ dịch làm 378 người bị ngộ độc do dùng phomai và sữa tươi có nhiễm tụ cầu (L. Simeão do Carmo và ctv, 2002). Tại Pháp, năm 1997 người ta tìm thấy *S. aureus* là tác nhân gây ra 569 trong tổng số 1142 vụ ngộ độc thực phẩm (J.P. Rosec và O. Gigaud, 2002).

Ở Nhật, từ năm 1994 đến năm 1998 số trường hợp ngộ độc do tụ cầu chiếm 3,1-11,9% tổng số các vụ ngộ độc thực phẩm do vi khuẩn. Ngày 17/6/1999, 21 trong số 53 công nhân sau khi ăn trưa tại căn tin công ty ở Shizuoka Prefecter thì có biểu hiện bệnh, trong đó có 8 trường hợp phải nhập viện (Norinaga Miwa và ctv, 2000).

2.4. Phương pháp phát hiện *Staphylococcus aureus*

2.4.1. Phương pháp truyền thống

2.4.1.1. Phương pháp định tính

Cho dung dịch mẫu vào môi trường TSB, ủ 37°C trong 24 giờ, sau đó cấy ria lên môi trường thạch BP (Baird Paker), ủ 37°C trong 48 giờ. Tìm khuẩn lạc đặc trưng của *S. aureus* trên môi trường BP có màu đen nhánh, sáng, tròn, lồi, đường kính 1-1,5 mm, có vòng sáng chung quanh khuẩn lạc để cấy sang môi trường BHI (Brain Heart Infusion), ủ 37°C trong 24 giờ. Sau đó cấy sang ống nghiệm nhỏ có chứa 0,3 ml huyết tương để thử phản ứng đông kết (phản ứng coagulase), thực hiện song song một ống đối chứng không được cấy dịch vi sinh vật, theo dõi kết quả đông huyết tương sau các khoảng thời gian 2, 4, 6, 8 và 24 giờ. Mẫu được kết luận là có *S. aureus* khi thử nghiệm coagulase dương tính.

Ngoài ra, ta còn có thể sử dụng bộ thuốc thử STAPHYLATEX (Saulatex), là bộ thuốc thử phân biệt *Staphylococcus aureus* với các vi khuẩn *Staphylococci* coagulase âm tính. STAPHYLATEX gồm 2 loại thuốc thử: thuốc thử A phát hiện được protein A và thuốc thử B phát hiện được yếu tố kết cụm của *S. aureus*. Thử nghiệm dựa trên

nguyên tắc của phản ứng tụ, thực hiện được dễ dàng trên lame soi kính hiển vi và kết quả đọc bằng mắt thường (Vương Thị Việt Hoa, 2002).

2.4.1.2. Phương pháp định lượng

◆ Phương pháp đếm khuẩn lạc

- Đồng nhất mẫu và pha loãng mẫu thành các dãy thập phân 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , ...

- Phân lập trên môi trường chọn lọc

Trải đều 0,1 ml mẫu nguyên hoặc đã pha loãng trên môi trường thạch BP, ủ 37°C trong 24-48 giờ. Sau 48 giờ, khuẩn lạc *S. aureus* có đường kính khoảng 0,5-1 mm, màu đen bóng, lồi, có vòng trắng đục hẹp và vòng sáng rộng khoảng 2-4 mm quanh khuẩn lạc. Khuẩn lạc một số dòng có thể không tạo các vòng sáng quanh khuẩn lạc như trên. (J Harvey và A Gilmour, 2000).

- Kháng định

Chọn 5 khuẩn lạc đã đếm cấy chuyển sang môi trường thạch TSA (Tryptic soya agar), ủ 37°C trong 24 giờ. Lấy sinh khối vi khuẩn từ môi trường TSA cho vào huyết tương để thử phản ứng coagulase.

- Tính kết quả

Mật độ *S. aureus* trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$\text{Mật độ (cfu/g hay cfu/ml)} = \text{NR} / \text{nVF}$$

Trong đó:

N: tổng số khuẩn lạc đặc trưng.

n: số đĩa tại mỗi nồng độ.

V: thể tích cấy vào đĩa.

F: độ pha loãng.

R: tỉ lệ dương tính.

$$(\text{R} = \text{số KL cho coagulase dương tính} / \text{số KL đã thử}).$$

◆ Phương pháp MPN (Most Probable Number Method)

Phương pháp này được dùng để định lượng *S. aureus* trong mẫu có mật độ *S. aureus* thấp nhưng mật độ vi sinh vật cạnh tranh cao, khó có thể xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Dung dịch mẫu được pha loãng thập phân với 3 độ pha loãng liên tiếp. Tùy theo yêu cầu về độ chính xác của kết quả phân tích, có thể sử dụng phương pháp MPN với hệ thống 9 ống nghiệm (3 độ pha loãng với 3 lần lặp lại ở mỗi độ pha

loãng) hay hệ thống 15 ống nghiệm (3 độ pha loãng với 5 lần lặp lại ở mỗi độ pha loãng).

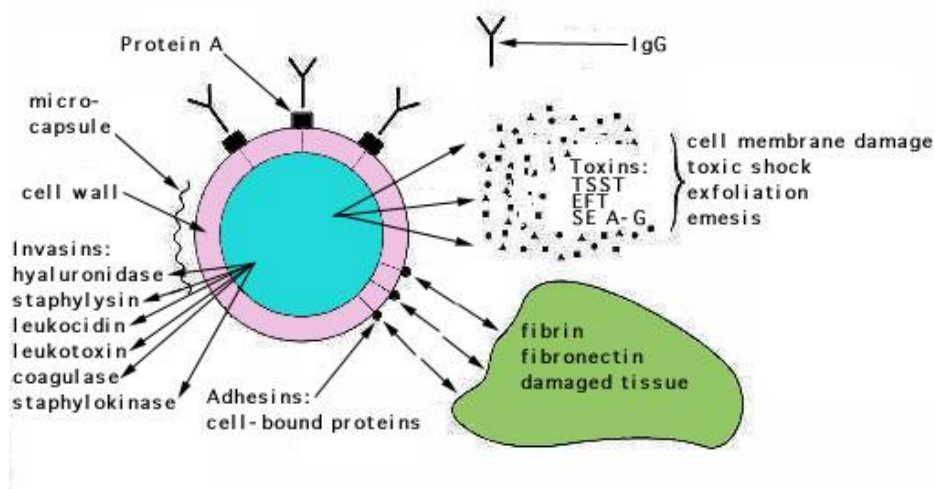
Cấy 1 ml dịch mẫu ở các độ pha loãng khác nhau vào môi trường được sử dụng là canh TSB chứa 10% NaCl, 1% sodium pyruvate, ủ ở 37°C trong 48 giờ. Chọn các ống dương tính có vi sinh vật phát triển làm đục môi trường để tiến hành phân lập khuẩn lạc đơn trên môi trường thạch BP, ủ ở 37°C trong 48 giờ. Chọn các khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường BP để thực hiện thử nghiệm khẳng định *S. aureus* tương tự như phương pháp đếm khuẩn lạc. Các đĩa cho kết quả khẳng định *S. aureus* dương tính được đối chiếu với các ống nghiệm trong hệ thống các dãy ống nghiệm ban đầu và ghi lại số ống nghiệm dương tính ứng với mỗi nồng độ pha loãng. Tra bảng MPN để suy ra mật độ *S. aureus* trong mẫu (số MPN/g hay MPN/ml) (Trần Linh Thuộc, 2002).

2.4.2. Phương pháp hiện đại

Phương pháp truyền thống tuy được sử dụng từ rất lâu, được nhiều quốc gia công nhận nhưng cũng có những nhược điểm nhất định như mất nhiều thời gian, công sức, tốn kém, thường phải mất khoảng 4-5 ngày mới xác định được mẫu có nhiễm *S. aureus* không. Để khắc phục những nhược điểm này, gần đây việc ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại để phát hiện và phân biệt các tác nhân gây bệnh ngày càng trở nên quan trọng hơn trong vệ sinh thực phẩm (Viktoria Atanassova và ctv, 2002). Trong đó phương pháp PCR (polymerase chain reaction) được nhiều nhà khoa học sử dụng do phương pháp này nhanh, dễ thao tác, nhạy và chuyên biệt (Beatriz Pinto và ctv, 2005). Trong các phản ứng PCR phát hiện *S. aureus*, người ta thường dùng các môi chuyên biệt để phát hiện gen *nuc* mã hóa nuclease chịu nhiệt, các gen mã hóa độc tố ruột (enterotoxin), gen *tst* (gây hội chứng sốc), gen *eta* và *etb* (mã hóa độc tố A và B gây mảng tróc), vùng đệm rDNA 16-23S và rDNA 23S (Beatriz Pinto và ctv, 2004). Ngoài ra còn có nhiều phương pháp dựa trên PCR được dùng để phát hiện nhanh tụ cầu như inter-IS256 PCR, *spa* typing (H.L. Wei và C.-S. Chiou, 2002), hay phương pháp DNA fingerprinting cũng như phương pháp RLPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) để phân loại các dòng *S. aureus* và kỹ thuật PCR-RFLP (Randomly Fragment Length Polymorphism) để phân tích gen *aroA* (Beatriz Pinto và ctv, 2004).

2.5. Các yếu tố độc lực của *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus gây ra nhiều bệnh nhiễm trùng, tạo mủ và gây độc ở người. Thường xảy ra ở những chỗ xây xước trên bề mặt da như nốt, gây ra nhiều bệnh nhiễm nghiêm trọng như viêm phổi, viêm vú, viêm tĩnh mạch, viêm màng não, nhiễm trùng tiểu và những bệnh nguy hiểm khác như viêm xương tủy, viêm màng trong tim. *S. aureus* cũng là nguyên nhân chủ yếu của việc nhiễm trùng vết mổ và những vụ nhiễm trùng do dụng cụ y khoa. *S. aureus* còn gây ngộ độc thực phẩm do tạo độc tố ruột enterotoxin trong thực phẩm, và gây hội chứng shock độc tố do chúng tạo ra siêu kháng nguyên trong máu (Kenneth Todar, 2005).



Hình 2.3. Các yếu tố độc lực của *Staphylococcus aureus*

(Nguồn: Theo Kenneth Todar, 2005)

S. aureus tạo nhiều yếu tố độc lực (Kenneth Todar, 2005; Mary K.Sandel và John L.McKillip, 2002):

2.5.1. Protein bề mặt: thúc đẩy việc bám dính vào tế bào chủ. Ngoài ra, hầu hết các dòng đều tạo protein gắn kết fibronogen và fibronetin làm kích thích sự kết dính các khối máu và mô bị chấn thương. Các protein gắn kết chất tạo keo cũng thường gặp ở những dòng gây bệnh viêm xương tủy và viêm khớp.

2.5.2. Yếu tố xâm lấn (hemolysins, leukocidin, kinase, hyaluronidase): giúp vi khuẩn lan ra trên mô, phân hủy màng tế bào eukaryote.

◆ Hemolysin

- α – toxin (α – hemolysin): đây là độc tố khử màng mạnh nhất của *S. aureus*. Nó ở dạng một monomer gắn kết với màng tế bào mẫn cảm. Ở người, tiểu

cầu và bạch cầu đặc biệt nhạy với α – toxin do chúng có thụ thể chuyên biệt nhận diện và cho phép độc tố gắn kết hình thành lỗ nhỏ mà cation hóa trị một có thể qua được.

- β – toxin: đây là một mạch enzyme phân hủy màng giàu lipid.

Thử nghiệm đối với β – toxin là phản ứng phân hủy hồng cầu cừu.

- δ – toxin: là một độc tố có peptide nhỏ. δ – toxin có thể phân hủy một số dạng tế bào khác nhau.

- ◆ Leukocidin: là protein đa thành phần, do nhiều thành phần riêng rẽ hợp lại phân hủy màng. Leukocidin cũng phân hủy máu nhưng yếu hơn α – hemolysin.

Chỉ 2% trong tất cả các dòng *S. aureus* có thể tạo leukocidin, nhưng đến gần 90% các dòng phân lập từ vết xước trên da có tạo độc tố này.

- ◆ Hyaluronidase: làm giảm chất gian bào của tế bào chủ và có thể giúp tụ cầu lan rộng sang các vùng xung quanh.

- ◆ Catalase: có chức năng bất hoạt hydrogen peroxide và các gốc tự do hình thành do hệ thống myeloperoxidase trong tế bào chủ.

- ◆ Coagulase và yếu tố gây đông: coagulase là một enzyme ngoại bào sẽ gắn với prothrombin trong tế bào chủ hình thành phức hợp staphylothrombin. Coagulase là một chỉ thị thường dùng để phát hiện *S. aureus* ở các phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, đa số bằng chứng cho thấy rằng đây không phải là yếu tố gây độc, mặc dù chúng có thể tự bảo vệ khỏi sự thực bào và đáp ứng miễn dịch bằng cách gây đông. Có một số nhầm lẫn về mối liên quan giữa coagulase và yếu tố gây đông đầu là yếu tố quyết định sự gắn kết fibrinogen trên bề mặt tế bào *S. aureus*. Một vài nghiên cứu cho thấy thật sự chỉ có một lượng nhỏ coagulase trên bề mặt tế bào vi khuẩn và chúng phản ứng với prothrombin làm đông sợi fibrin. Nhưng những nghiên cứu di truyền chỉ ra rằng không thể giải thích rõ là coagulase và yếu tố gây đông có tồn tại riêng biệt hay không. Bởi vì những đột biến thiếu coagulase vẫn duy trì hoạt tính yếu tố gây đông và những đột biến thiếu yếu tố gây đông vẫn biểu hiện hoạt tính coagulase bình thường (Kenneth Todar, 2005).

- ◆ Staphylokinase: đây là yếu tố phân giải fibrin. Một phức hợp sẽ được hình thành giữa staphylokinase và plasminogen kích hoạt hoạt tính phân giải protein giúp phân hủy fibrin. Cũng như coagulase, không có đủ bằng chứng để cho thấy

staphylokinase là yếu tố gây độc, mặc dù việc phân giải fibrin giúp cho sự lan rộng của tụ cầu.

◆ Các enzyme ngoại bào khác

○ TNase: là enzyme kháng nhiệt, có khả năng hidro hóa DNA và RNA của tế bào chủ.

○ DNase, protease, lipase: cung cấp chất dinh dưỡng cho vi khuẩn, có tác động gây bệnh thấp.

○ FAME (fatty acid modifying enzyme): là enzyme rất quan trọng ở những chỗ bị áp-xe, đó là nơi chúng có thể biến đổi những lipid kháng khuẩn và kéo dài sự sống của vi khuẩn.

2.5.3. Các yếu tố chống lại sự tự vệ của tế bào chủ

◆ Capsule polysaccharide: còn gọi là microcapsule do ta chỉ có thể nhìn thấy chúng dưới kính hiển vi điện tử. Trong các mẫu bệnh phẩm, *S. aureus* có thể tạo ra một lượng lớn polysaccharide nhưng khả năng này sẽ giảm nhanh khi đưa chúng vào nuôi cấy trong phòng thí nghiệm. Chức năng gây độc của vỏ capsule không rõ lắm mặc dù chúng có thể ngăn chặn sự thực bào.

◆ Protein A: là protein bề mặt có thể gắn phân tử IgG nhờ vùng Fc. Trong huyết thanh, vi khuẩn sẽ gắn các phân tử IgG sai hướng làm phá hủy sự opsonin hóa và sự thực bào. Các chủng *S. aureus* đột biến thiếu protein A cho sự thực bào trong ống nghiệm hiệu quả hơn, và những đột biến trên mẫu nhiễm sẽ làm giảm độc tính.

◆ Leukocidin: *S. aureus* tạo độc tố rõ nhất trên các bạch cầu đa nhân. Sự thực bào là một cơ chế quan trọng chống lại sự nhiễm tụ cầu, do đó leukocidin là một yếu tố gây độc.

◆ Exfoliative exotoxin: gồm hai loại ETA và ETB. Chúng gây hội chứng phỏng da ở trẻ sơ sinh (Scalded Skin Syndrome) và gây chốc lở (Bullous Impetigo) ở cả trẻ em và người lớn.

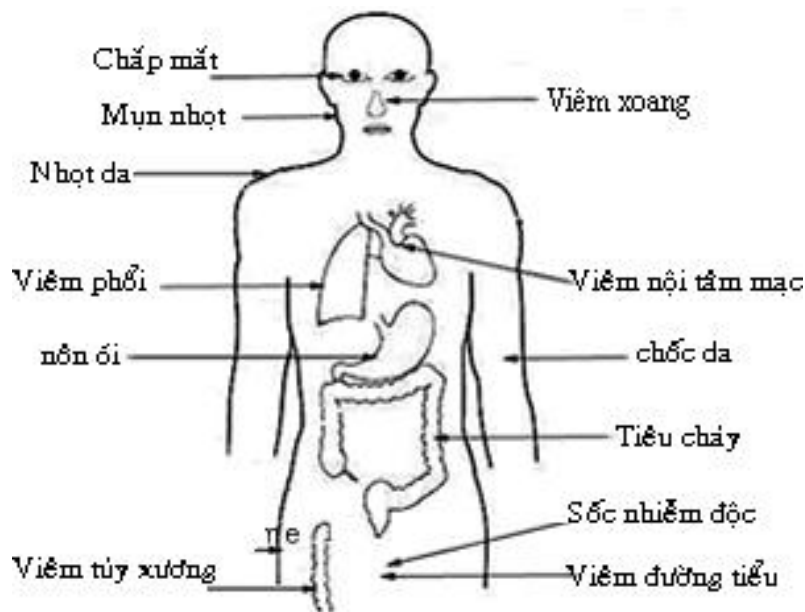
◆ Các siêu kháng nguyên (superantigen): *S. aureus* tiết ra hai dạng độc tố có hoạt tính siêu kháng nguyên:

○ TSST-1(Toxic shock syndrom toxin) được tiết ra gây hội chứng sốc nhiễm độc tụ cầu (TSS).

○ Enterotoxin gây nôn mửa và tiêu chảy, thường xảy ra ở các vụ ngộ độc thực phẩm.

75% hội chứng sốc nhiễm độc tụ cầu là do TSST-1 gây ra và thường gặp trên phụ nữ ở giai đoạn hành kinh. Ngoài ra, enterotoxin B và C cũng gây ra 50% hội chứng này nhưng không liên quan đến kinh nguyệt. TSS có thể xảy ra khi nhiễm tụ cầu nếu như enterotoxin hoặc TSST-1 được tiết ra có hệ thống và tế bào chủ thiếu những kháng thể trung hòa thích hợp.

Những siêu kháng nguyên này sẽ kích hoạt những tế bào T không chuyên biệt vốn không nhận được những kháng nguyên thông thường. Hơn 1 trong số 5 tế bào T bị kích hoạt, trong khi chỉ có 1 trong số 10000 bị kích hoạt khi dùng kháng nguyên thông thường và cytokine được tiết ra với lượng lớn gây ra hội chứng này (Kenneth Todar, 2005).



Hình 2.4. Vị trí nhiễm và gây bệnh của *S. aureus*

(Nguồn: Theo William G. Gilroy, 2005)

Chính những khả năng tạo ra nhiều yếu tố độc lực mà *S. aureus* trở thành một trong những tác nhân gây bệnh chính ở người. Chúng có thể xâm nhiễm ở nhiều nơi trên cơ thể và gây ra nhiều triệu chứng bệnh khác nhau (Naomi Balaban và Avraham Rasooly, 2000) (Hình 2.4). Trong đó enterotoxin là dạng độc tố chịu nhiệt gây bệnh đường ruột thường gặp trong các vụ ngộ độc thực phẩm liên quan đến tụ cầu.

2.6. Độc tố ruột enterotoxin của *Staphylococcus aureus*

2.6.1. Cấu trúc

Staphylococcal enterotoxin (SE) là những chuỗi protein đơn có trọng lượng phân tử thấp, từ 25000-29000 dalton, mỗi chuỗi có những vị trí kháng nguyên chuyên biệt. Đặc điểm chính trong cấu trúc của độc tố là vòng cystein ở giữa phân tử. Vai trò của những vòng cystein chưa được biết rõ. Tuy nhiên, người ta chứng minh được chính những vòng cystein này giúp ổn định cấu trúc phân tử và có thể góp phần vào việc kháng sự phân giải protein. Theo sau vòng cystein là chuỗi acid amin cần thiết, ban đầu người ta nghĩ rằng trình tự này là vị trí hoạt động, nhưng những thí nghiệm thay thế amino acid vẫn chưa xác nhận được điều này (Merlin S Bergdoll, 2000).

2.6.2. Phân loại

Số loại SE khác nhau ở nhiều tài liệu khác nhau tùy thuộc vào năm phát hiện và vai trò của các SE trong các vụ ngộ độc thực phẩm do tụ cầu (Yves Le Loir, 2002). Do số lượng SE khá lớn nên rất cần thiết phải phân loại và sắp xếp chúng. Năm 1962, người ta đã đưa ra hệ thống sắp xếp các độc tố theo bảng chữ cái (Mary K. Sandel và John L. McKillip, 2002). Đầu tiên 5 loại SE được tìm thấy và phân loại dựa vào tính kháng nguyên của chúng, đó là độc tố A (SEA), độc tố B (SEB), độc tố C (SEC), độc tố D (SED) và độc tố E (SEE). Trong đó, SEC được chia thành SEC₁, SEC₂, SEC₃. Sau đó, các SE mới cùng với các gen tương ứng được tìm thấy và đánh dấu từ SEG đến SER và SEU (*seg-ser, seu*) (H.J. Jorgensen, 2004). Không có độc tố SEF vì F là kí tự dùng để chỉ TSST-1 (Merlin S Bergdoll, 2000; J.M. Fueyu, 2000). Tuy nhiên sự liên quan giữa các SE mới này đến các vụ ngộ độc thì chưa rõ, hiện nay hầu hết các bộ test thương mại chỉ thích hợp để xác định các độc tố từ SEA đến SEE là các độc tố thường gặp nhất trong các vụ ngộ độc (Capucine Letetre và ctv, 2003; H.J. Jorgensen và ctv, 2004), và theo J.P. Rosec và O. Gigaud (2002) thì khoảng 5% các vụ ngộ độc do tụ cầu là do các độc tố enterotoxin mà ta chưa biết gây ra.

Trong các loại độc tố trên thì SEA thường gặp nhất trong các vụ ngộ độc do tụ cầu (Lenz W và ctv, 1983; H.Y. Tsen, 1996; Naomi Balaban và Avraham Rasooly, 2000; Capucine Letetre và ctv, 2003). Các dòng *S. aureus* tạo độc tố SEA có tần số cao nhất trong các mẫu thực phẩm (61,5%) và trên những người khỏe mạnh (53,6%). Ngoài ra, C. Vernozy-Rozand và ctv (2004) cũng nhận thấy rằng SEA là nguyên nhân của 75% các vụ ngộ độc do tụ cầu, tiếp đến là SED, SEC và SEB, các vụ dịch do SEE thường rất ít gặp.

2.6.3. Tính chất

SE là những protein đơn giản, hút ẩm, dễ tan trong nước và nước muối, là những protein cơ bản, độ đẳng điện pI là 7-8,6, trừ SEG và SEH có độ đẳng điện pI tuần tự là 5,6 và 5,7. Độ ẩm cao nhất là 277 nm, cao hơn so với những protein thông thường. Dù có một mức độ tương đồng giữa các SE, nhưng vẫn có sự khác nhau giữa các trình tự amino acid làm cho các độc tố có các vị trí kháng nguyên khác nhau (Merlin S Bergdoll, 2000).

SE giàu lysine, acid aspartic, acid glutamid và tyrosine. Hầu hết có vòng cystine tạo cấu trúc thích hợp có thể liên quan đến hoạt tính gây nôn. Chúng có tính ổn định cao, kháng với hầu hết các enzyme phân hủy protein và vì thế chúng giữ được hoạt tính trong ống tiêu hóa sau khi được ăn vào bụng. Chúng còn kháng với chymotrypsine, rennin và papain (Yves Le Loir và ctv, 2003). Đặc biệt, tính bền nhiệt là một trong những tính chất quan trọng nhất của các SE trong lĩnh vực an toàn thực phẩm. Chúng không bị phân hủy ở 100°C trong 30 phút (Trần Linh Thuốc, 2002), thậm chí ở 121°C trong 28 phút thì những SE vẫn giữ được hoạt tính sinh học (khi thí nghiệm trên mèo) (Naomi Balaban và Avraham Rasooly, 2000), tính kháng nhiệt của SE trong thực phẩm cao hơn so với trong môi trường nuôi cấy (Yves Le Loir và ctv, 2003).

2.6.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển và việc tạo độc tố SE của tụ cầu

Mặc dù SE được tạo ra ở khoảng điều kiện rất rộng nhưng cũng giống như sự phát triển của tụ cầu, cũng có những giới hạn về nhiệt độ, độ ẩm và độ pH làm giảm hay ức chế sự tạo độc tố của *S. aureus*. Thường thì tụ cầu phát triển đến 10^6 cfu/g thì có thể tạo SE (L.Simeão do Carmo, 2002; Yves Le Loir và ctv, 2003). Các dòng tụ cầu khác nhau cần các amino acid khác nhau cho sự phát triển và tạo độc tố (Yves Le Loir và ctv, 2003). Điều kiện thích hợp nhất để tạo độc tố là pH trung tính và giảm hay bị ức chế ở pH acid, thường là khi pH <5 và độ ẩm thấp (dưới 0,86) (Rosamund M.Baird và W.H.Lee, 1995). Bên cạnh đó, L.C. Braga và ctv (2004) cũng đã tìm thấy rằng dịch chiết từ lựu, ngoài tác dụng kháng khuẩn còn có thể ức chế tạo độc tố enterotoxin.

Glucose cũng là một thành phần ức chế sự tạo độc tố, đặc biệt là SEB và SEC (Yves Le Loir và ctv, 2003) do sự trao đổi glucose làm giảm pH. Ngoài ra, nồng độ muối cao (trên 12%) cũng làm ức chế sự tạo độc tố. Đặc biệt, *S. aureus* rất nhạy với vi sinh vật cạnh tranh. Genigeorgis (1989) đã chứng minh rằng khi các vi sinh vật cạnh

tranh có trong sữa với mật độ cao sẽ làm giảm tỉ lệ phát triển cũng như tạo độc tố của tụ cầu (Trích dẫn bởi Yves Le Loir và ctv, 2003).

Các vụ ngộ độc tụ cầu vẫn thường xảy ra ngay trên cả những thực phẩm đã nấu chín do SE kháng với hầu hết protease và có tính bền nhiệt tốt. Khi nấu chín hoặc thanh trùng thì giết được tụ cầu nhưng không hề ảnh hưởng đến SE. Tuy nhiên, SE có thể bị bất hoạt bằng cách xử lý nhiệt được sử dụng để vô trùng thực phẩm đóng hộp khi SE ở nồng độ thấp (Yves Le Loir và ctv, 2003). Tính bền nhiệt của SE phụ thuộc vào môi trường, thực phẩm, độ pH, nồng độ muối và nhiều yếu tố khác.

2.6.5. Những hoạt tính của độc tố SE

Các độc tố tụ cầu SE thuộc họ độc tố gây sốt, làm biểu hiện miễn dịch và tăng nhanh số lượng tế bào T không chuyên biệt. Trong số các siêu kháng nguyên đó thì chỉ có SE là có hoạt tính gây nôn. Hoạt tính siêu kháng nguyên và hoạt tính gây nôn là hai chức năng của hai protein riêng biệt nhưng sự liên hệ giữa hai hoạt tính này vẫn chưa được làm rõ. Tuy nhiên trong hầu hết trường hợp, hai hoạt tính này tồn tại song song nhau, những đột biến làm mất hoạt tính siêu kháng nguyên cũng làm mất hoạt tính gây nôn (Yves Le Loir và ctv, 2003).

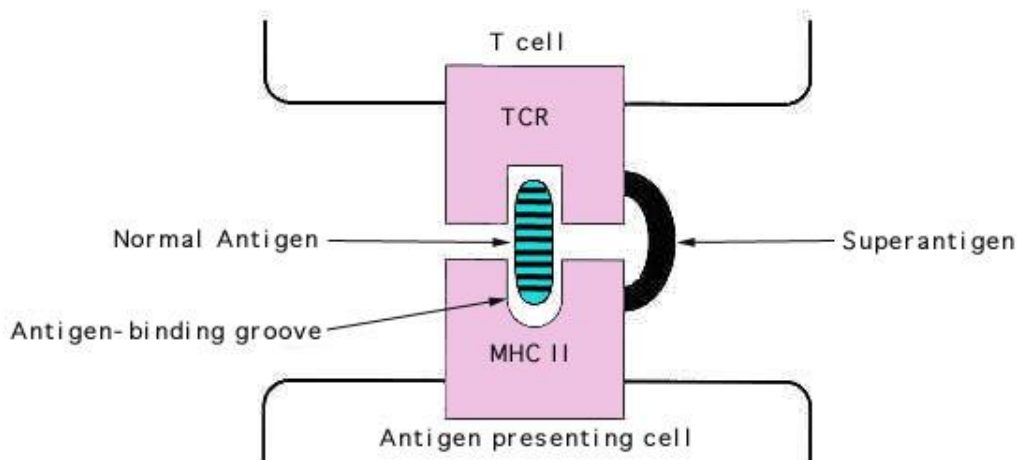
2.6.5.1. Hoạt tính siêu kháng nguyên

Hoạt tính siêu kháng nguyên là do tác động trực tiếp của SE với thụ thể kháng nguyên tế bào T và phức hợp hòa màng của tế bào nhận diện kháng nguyên (Yves Le Loir và ctv, 2003).

Sự nhận diện của kháng nguyên là bước đầu tiên trong đáp ứng miễn dịch tế bào và đó cũng là vấn đề then chốt quyết định mức độ chuyên biệt của đáp ứng miễn dịch. Một kháng nguyên thông thường nhận diện được thụ thể tế bào T bằng cách hình thành những peptide gắn kết với phức hợp hòa màng MHC lớp I hoặc II. Chỉ một vài tế bào T có thể nhận diện được một kháng nguyên chuyên biệt trên phức hợp hòa màng của tế bào nhận diện kháng nguyên (Yves Le Loir và ctv, 2003).

Trong khi đó, các độc tố siêu kháng nguyên tác động trực tiếp lên nhiều tế bào T bằng cách nhận diện các chuỗi V β chuyên biệt của thụ thể kháng nguyên tế bào T. Các độc tố này có thể liên kết chéo với thụ thể kháng nguyên tế bào T và phức hợp tương đồng lớp 2 của tế bào nhận diện kháng nguyên. Chính sự liên kết chéo này dẫn đến việc hoạt hóa không chuyên biệt làm tăng nhanh lượng tế bào T và lượng interleukin khổng lồ là những yếu tố có thể liên quan đến cơ chế gây độc của SE (hình

2.5). Do đó các SE có thể hoạt hóa 10% tế bào T của chuột, trong khi những kháng nguyên thông thường kích hoạt ít hơn 1% tế bào T (Merline S Bergdoll, 2000).



Hình 2.5. Hoạt tính siêu kháng nguyên

(Nguồn: Theo Kenneth Todar, 2005)

2.6.5.2. Hoạt tính gây nôn

Hoạt tính gây nôn không được mô tả rõ như là hoạt tính siêu kháng nguyên. Chỉ SE có thể gây nôn mửa khi đưa vào cơ thể khi bằng đường miệng trong khi các siêu kháng nguyên khác thì không gây nôn (Yves Le Loir và ctv, 2003). SE tác động trực tiếp lên biểu mô ruột và kích thích trung khu gây nôn dẫn đến những triệu chứng của ngộ độc thực phẩm. Liều gây ngộ độc do tụ cầu ước khoảng 0,1 μg , liều này có thể thay đổi ở những người nhạy cảm. Đặc điểm chung nhất giữa các SE là vòng cystine và đây được cho là yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến hoạt tính gây nôn (Yves Le Loir và ctv, 2003). Tuy nhiên, hai độc tố SEB và SEC_1 có thể bị chặn ngang ở vòng cystein mà vẫn không trung hòa phản ứng gây nôn (Merlin S Bergdoll, 2000), hay SEI thiếu vòng cystine nhưng có cả hai hoạt tính kháng nguyên và gây nôn, dù tính gây nôn yếu hơn các SE khác (Yves Le Loir và ctv, 2003).

2.6.6. Phương pháp phát hiện độc tố SE

Việc phát hiện độc tố trong thực phẩm cần những phương pháp nhạy với lượng thấp, ít hơn 1ng/g thực phẩm. Lượng độc tố có ở thực phẩm trong các vụ ngộ độc thực phẩm thay đổi từ < 1 đến > 50 ng/g. Một số vụ dịch xảy ra chỉ với lượng độc tố thấp

hơn mức ng/g. Do đó cần phải sử dụng một phương pháp cực nhạy để xác định độ an toàn của thực phẩm.

Mặc dù đã có những báo cáo về thử nghiệm sinh học trên mèo, khí và tinh tinh nhưng người ta thường sử dụng phương pháp miễn dịch để phát hiện SE hơn. Điều này là do chỉ vài phòng thí nghiệm có điều kiện thử nghiệm trên thú và chỉ được dùng với những mục đích đặc biệt (Merlin S Bergdoll, 2000) .

2.6.6.1. Phương pháp khuếch tán trên gel (gel diffusion)

Đây là phương pháp miễn dịch được lựa chọn sử dụng trong nhiều năm. Phương pháp microslide là phương pháp nhạy nhất trong các phương pháp gel-diffusion (0,05-0,1 µg/ml), nhưng cần phải chuẩn bị slide. Tuy nhiên, kết quả rất khó giải thích. Nhiều trường hợp có thể cho kết quả sai, đòi hỏi có nhiều kinh nghiệm.

Phương pháp ống gel khuếch tán đơn mà Oudin phát triển năm 1952 được sử dụng để phát hiện độc tố ruột, ban đầu là độc tố ruột của các dòng *Staphylococci*. Những kháng thể đặc hiệu trong gel được đặt ở đáy của ống tube có đường kính 4 mm, và dịch độc được cho vào phần trên đỉnh của miếng gel. Phản ứng giữa độc tố và kháng thể làm hình thành band ngưng kết có chiều dài tăng theo thời gian khi độc tố ruột khuếch tán vào trong agar. Phương pháp này được sử dụng như là một phương pháp phân tích vì có mối liên hệ trực tiếp giữa lượng độc tố ruột trong mẫu và chiều dài band trên gel, đồng thời đây cũng là phương pháp sàng lọc để kiểm tra những dòng *Staphylococci* tạo độc tố.

Vấn đề chính của phương pháp gel-diffusion là ít nhạy khi lượng ở mức tối thiểu, mà với lượng tối thiểu là 50-100 ng/ml độc tố không đủ để phát hiện độc tố trong thực phẩm (Merlin S Bergdoll, 2000).

2.6.6.2. Phương pháp miễn dịch phóng xạ - RIA (Radio Immunoassay)

Phương pháp nhạy đầu tiên được sử dụng để phát hiện độc tố trong thực phẩm là kỹ thuật miễn dịch phát phóng xạ (RIA), trong phương pháp này độc tố được đánh dấu bằng ¹²⁵I. Dịch trích thực phẩm được cho vào cùng với kháng thể chuyên biệt trong một ống nhựa nhỏ trước khi thêm độc tố được iodinated. Sản phẩm của phản ứng được làm kết tủa là những tế bào *S. aureus* chứa protein A. Sau đó bỏ dịch nổi, đo tính phóng xạ chất kết tủa và xác định lượng độc tố trong dịch trích thực phẩm. Hiện nay người ta không còn sử dụng phương pháp này nữa vì đã có những phương pháp mới hơn không cần dùng những vật liệu có tính phóng xạ (Merlin S Bergdoll, 2000).

2.6.6.3. Phương pháp RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination)

Kỹ thuật RPLA được ứng dụng để phát hiện độc tố trong thực phẩm cũng như phát hiện những dòng *Staphylococcus* có độc tố dương tính. Trong kỹ thuật này, hạt nhựa được phủ kháng thể của độc tố trước khi cho vào giếng. Cho mẫu vào để tạo phản ứng. Nếu có độc tố trong mẫu thì phản ứng giữa độc tố và kháng thể sẽ tạo ra sự ngưng kết, tùy mức độ ngưng kết mà xác định được lượng độc tố. Phương pháp này đủ nhạy để phát hiện độc tố trong hầu hết thực phẩm của các vụ ngộ độc, cũng như trong việc phát hiện những dòng *Staphylococcus* tạo ra lượng độc tố thấp mà phương pháp gel-diffusion không phát hiện được, chỉ với khoảng 10–20 ng/ml. Bộ kit RPLA được giới thiệu bởi công ty Denka Seiken, Niigata, Nhật Bản và được bán tại Mỹ (Merlin S Bergdoll, 2000).

2.6.6.4. Phương pháp PCR (polymerase chain reaction)

Gần đây phương pháp PCR được sử dụng phổ biến để phát hiện độc tố *Staphylococcus* dựa vào việc tổng hợp mỗi chuyên biệt cho đoạn gen mã hóa độc tố. Các phản ứng PCR thường dùng là uniplex và multiplex PCR, và gần đây là real-time PCR (Beatriz Pinto và ctv, 2005). Phương pháp này cũng được ứng dụng để phát hiện các gen tạo độc tố mới như gen mã hóa cho độc tố SEU trên vùng *egc* của *S. aureus* (C. Letertre, 2003).

Các phương pháp dựa trên PCR nhạy và chuyên biệt, cho phép phát hiện *Staphylococcus* tạo độc tố trong thời gian tương đối ngắn với lượng mẫu nhỏ. Ưu điểm của phương pháp này là những tế bào sinh độc tố đã chết vẫn có thể phát hiện, điều này rất quan trọng trong việc phân tích những thực phẩm đã xử lý nhiệt liên quan đến những vụ ngộ độc thực phẩm (Merlin S Bergdoll, 2000).

Tuy phương pháp PCR có nhiều ưu điểm là nhanh, nhạy, chuyên biệt nhưng chỉ có thể xác định có sự hiện diện của các gen mã hóa độc tố mà không thể xác định được có tạo độc tố hay không cũng như việc định lượng độc tố (J.A. Boerema, 2005).

2.6.6.5. Phương pháp hấp phụ miễn dịch dùng enzyme - ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Phương pháp ELISA được ứng dụng để phát hiện độc tố *S. aureus* trong thực phẩm khá phổ biến (Nighat P.Kokan và Merline S Bergdoll, 1987; J.P.Rosec và ctv, 1997; Susana M. Portocarrero và ctv, 2002; Hiroshi Fujikawa và Satoshi Morozumi,

2005). Đây là phương pháp đơn giản, nhạy, nhanh, có thể phát hiện cũng như định lượng độc tố và có nhiều bộ kit phát hiện độc tố đang được bán trên thị trường.

Kiểu ELISA thường gặp nhất là phương pháp sandwich. Trong phương pháp này, kháng thể được gắn với mẫu chưa biết, sau đó phức hợp kháng thể - độc tố được gắn với cộng hợp enzyme - kháng thể. Qui trình này được sử dụng nhiều vì lượng enzyme và màu được tạo ra từ phản ứng enzyme - cơ chất tỉ lệ thuận với lượng độc tố có trong mẫu chưa biết. Hai enzyme alkaline photphatase và horseradish peroxidase đều được dùng trong phương pháp này, nhưng alkaline photphatase dễ gắn với kháng thể hơn. Tuy nhiên horseradish peroxidase cho phản ứng nhạy hơn, khi kết hợp với cơ chất cho màu xanh lá, xanh dương hay cam, còn màu được tạo ra với cơ chất khi sử dụng với alkaline photphatase, p-nitrophenyl photphatase (pNPP) là màu vàng. Hầu hết các phương pháp ELISA nhạy ở ít nhất là 0,5 ng độc tố/ml (Merlin S Bergdoll, 2000).

Nhiều nhà khoa học sử dụng phương pháp ELISA để phát hiện độc tố *S. aureus* trong phòng thí nghiệm với nhiều qui trình khác nhau. Phương pháp ELISA chủ yếu sử dụng đĩa giếng (microtitre plate hay strip) để kháng thể gắn vào. Mẫu được cho vào giếng, nếu như trong mẫu có kháng nguyên mục tiêu, kháng nguyên sẽ gắn với kháng thể. Sau đó, lấy mẫu ra và rửa đĩa. Cộng hợp enzyme - kháng thể (kháng thể có gắn với enzyme horseradish peroxidase hoặc alkaline photphatase) được thêm vào và cho phép phản ứng với phức hợp độc tố - kháng thể. Rửa đĩa, thêm cơ chất đặc hiệu của enzyme vào. Enzyme xúc tác phản ứng thủy phân cơ chất tạo ra sản phẩm có màu. Đối chứng dương và đối chứng âm cũng được đưa vào thí nghiệm. Phản ứng dương tính được ghi nhận nếu như màu độc được đậm hơn màu ở đối chứng âm. Bằng cách theo dõi sự đổi màu, có thể phát hiện sự hiện diện và định lượng kháng nguyên (độc tố) (Merlin S Bergdoll, 2000; Trần Linh Thuớc, 2002).

Ngoài ra người ta còn sử dụng hạt polystyrene được gắn kháng thể. Phương pháp này nhạy hơn vì chỉ dùng 20 ml dịch trích thực phẩm. Những hạt mã màu được lấy ra khỏi dịch trích và đem rửa, mỗi hạt được cho vào đúng tube màu mã. Cho cộng hợp enzyme - kháng thể vào mỗi tube và có thể phản ứng với phức hợp độc tố - kháng thể. Rửa hạt trong tube nhiều lần, cho vào 1 ml cơ chất. Màu được tạo ra có thể đọc bằng mắt thường vì lượng độc tố không cần xác định trong việc xác định phản ứng

dương tính. Nếu sử dụng máy đọc màu thì phản ứng tạo màu sẽ được dừng lại sau 30 phút bằng acid sulfuric.

Hiện nay trên thị trường đã có nhiều bộ kit phát hiện SE. Trong đó phải kể đến TECRA, bộ kit phát hiện và định danh độc tố ruột enterotoxin (loại A đến E). Quy trình này có thời gian ngắn (4 giờ), nhạy (1ng/ml hay mg) và có thể phát hiện đồng thời sự hiện diện nhiều loại độc tố của tụ cầu, nhưng không thể phân biệt các loại độc tố. Bộ kit này dùng microtitre plate với các giếng đã được phủ hỗn hợp các kháng thể chuyên biệt của các độc tố từ A đến E; enzyme horseradish peroxidase, với 2,2-azino-di (3-ethylbenzthiazoline sulphonat), EDTA và NaH_2PO_4 là cơ chất. Phản ứng ELISA được thực hiện dựa trên kỹ thuật “sandwich”, và có tên thương mại là TECRATM (TECRA Diagnostic, Roseville, 2069, Australia). Đây là sản phẩm đầu tiên được chứng nhận bởi AOAC (Merlin S Bergdoll, 2000; Trần Linh Thuốc, 2002; J.A. Boerema, 2006) và được sử dụng khá rộng rãi để phát hiện các độc tố SE (D.L.K. Ng và L.Tay, 1992; Susana M. Portocarrero, 2001).

Ngoài ra còn có bộ kit RIDASCREEN của R-biopharm GmbH, Darmstadt, Germany. Bộ kit này dùng enzyme là horseradish peroxidase cùng với urea peroxidase và tetramethylbenzidine là cơ chất (Merlin S Bergdoll, 2000).

PHẦN 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH

3.1. Thời gian và địa điểm

3.1.1. *Thời gian thực hiện đề tài:* 2/2006 – 6/2006

3.1.2. *Địa điểm thực hiện:* Phòng Vi sinh Thực Phẩm – Khoa Dinh Dưỡng và Vệ Sinh An Toàn Thực Phẩm - Viện Vệ Sinh Y Tế Công Cộng TP.HCM.

3.2. Vật liệu

3.2.1. *Chủng S. aureus*

36 chủng *S. aureus* được phân lập từ các mẫu thực phẩm và bệnh phẩm.

3.2.2. *Thiết bị và dụng cụ*

- Nồi hấp vô trùng.
- Tủ ấm 37°C, 45°C.
- Tủ lạnh.
- Tủ cấy vô trùng.
- Lò viba, cân.
- Máy vortex (máy lắc).
- Máy ly tâm.
- Bể ổn nhiệt.
- Máy rửa giếng.
- Máy đọc kết quả ELISA.
- Ống nghiệm, đĩa petri, chai duran, cốc, đĩa thủy tinh, pipet 5ml, 10ml.
- Micropipet, đầu tip pipet, ống eppendoff, giấy thấm, giấy film dán.
- Que cấy, đèn cồn, giấy thử pH, găng tay y tế, gòn, lame.
- Bộ kit xác định enterotoxin của *S. aureus* (Tecra – Úc) có kèm các vật liệu sau: các giếng được phủ kháng thể kháng độc tố SE, vi để giữ giếng, bảng so màu.

3.2.3. *Hóa chất*

- Môi trường Chapman (MSA - Manitol Salt phenol-red Agar).
- Môi trường BP (Baird-Paker agar).
- Môi trường TSGM (Tecra Staphylococcus Growth Medium).
- Môi trường BHI (Brain Heart Infusion broth).

- TSB (Tryptic Soy Broth).
- Pepton đậm
- Huyết tương thỏ
- Hydrogen peroxid 3%, nước muối sinh lí, nước cất, cồn.
- Tím Gentian, Lugol, Safranin.
- Các hóa chất có sẵn trong bộ kit xác định độc tố SE (Tecra – Úc): dung dịch rửa; sample additive; đối chứng dương, đối chứng âm; cộng hợp, dung dịch pha cộng hợp; cơ chất, dung dịch pha cơ chất; chất dừng phản ứng.

3.3. Phương pháp

3.3.1. Bố trí thí nghiệm

Tiến hành khảo sát đậm độ và độc tố của *S. aureus* ở các thời điểm 0, 16, 24, 48 và 72 giờ trên hai môi trường nuôi cấy TSGM, BHI. Sử dụng phần mềm Stagraphic 7.0 và SPSS.

3.3.2. Quy trình thí nghiệm

3.3.2.1. Tuyển chọn các chủng *S. aureus*

a) Tăng sinh các chủng *S. aureus* trên môi trường TSB

Dùng micropipet hút 0,1 ml chủng *S. aureus* cho vào ống nghiệm chứa 5 ml TSB, ủ 37°C /18–24 giờ.

b) Kiểm tra các chủng *S. aureus*

■ Hình thái khuẩn lạc trên môi trường MSA và môi trường BP

- Dùng que cấy vòng ria canh khuẩn tăng sinh trong TSB (18-24 giờ) lên môi trường thạch MSA, lật ngược đĩa, ủ 37°C /24 giờ. Trên môi trường BP, ủ 37°C /48 giờ.

- Quan sát hình thái khuẩn lạc: trên môi trường MSA, *S. aureus* cho khuẩn lạc tròn, bờ đều và lồi, màu vàng nhạt đến vàng đậm. Trên môi trường BP, khuẩn lạc có màu đen nhánh, bóng, lồi, đường kính 1-1,5 mm, quanh khuẩn lạc có vòng sáng rộng 2-5 mm.

■ Nhuộm gram

- Làm phết vi khuẩn trên lame kính.
- Phủ phẩm tím Gentian lên phết vi trùng (10 giây).
- Rửa nước để loại phẩm thừa.

- Phủ dung dịch Lugol (20 giây).
- Rửa bằng cồn (5 giây).
- Rửa nước.
- Phủ Safranin (10 giây).
- Rửa nước.
- Thấm khô lame.
- Nhỏ giọt dầu lên phết nhuộm.
- Quan sát bằng kính hiển vi với vật kính nhúng dầu,

Staphylococcus aureus có hình cầu, màu tím, xếp thành từng chùm.

■ Thử nghiệm catalase và coagulase

◆ Thử nghiệm catalase

Dùng que cấy vòng lấy khuẩn lạc trên MSA (18-24 giờ) cho lên phiến kính sạch. Sau đó, dùng pipet Pasteur hay ống nhỏ giọt hút 1 giọt H₂O₂ 3% cho lên giọt canh khuẩn trên phiến kính. Quan sát, theo dõi sự sủi bọt:

- Phản ứng dương tính khi có sự sủi bọt ngay lập tức.
- Phản ứng âm tính khi không có sự sủi bọt.

◆ Thử nghiệm coagulase

Hoạt tính coagulase được thử bằng hai phương pháp: thử trên phiến kính và thử trong ống nghiệm, với chứng dương là *Staphylococcus aureus* và chứng âm là *Staphylococcus epidermidis*.

○ Thử trên lame kính:

Nhỏ lên lame kính 1 giọt nước cất hoặc nước muối sinh lý. Dùng que cấy vòng lấy một lượng lớn khuẩn lạc hoặc từ dịch nuôi cấy chủng thuần hòa vào giọt nước để tạo thành huyền phù có mật độ tế bào cao. Sau đó cho vào một vòng que cấy huyết tương thô, hòa đều tạo huyền phù đồng nhất. Quan sát, theo dõi sự đông tụ trong vòng 20 giây.

Đọc kết quả: Thử nghiệm là (+) khi có sự đông tụ rõ trong vòng 20 giây. Nếu không có kết tụ (-), cần thử nghiệm lại trong ống nghiệm.

○ Thử trong ống nghiệm:

Cho vào ống nghiệm 0,5 ml huyết tương thô không pha loãng, bổ sung 0,5 ml dịch nuôi cấy chủng thuần hoặc một lượng lớn (khoảng một vòng que cấy) sinh khối khuẩn lạc. Xoay nhẹ ống để trộn đều vi sinh vật. Ủ ống thử

nghiệm ở 37°C trong 4 giờ. Quan sát, ghi nhận sự đông tụ mỗi 30 phút. Nếu không có hiện tượng đông tụ thì ủ tiếp đến 24 giờ và đọc kết quả.

Đọc kết quả: Thử nghiệm là (+) khi có sự đông tụ, là (-) khi hỗn hợp không có sự đông tụ, hỗn hợp vẫn đồng nhất (Hình 3.1)



Hình 3.1. Kết quả phản ứng coagulase

3.3.2.2. Khảo sát đậm độ của vi khuẩn *S. aureus* theo thời gian

a) Tăng sinh các chủng *S. aureus*

Dùng micropipet hút 0,1ml *S. aureus* thuần cho vào ống nghiệm chứa 5 ml TSB, ủ 37°C /18 - 24 giờ.

b) Nuôi cấy các chủng *S. aureus* trên hai loại môi trường - BHI và TSGM

Môi trường BHI và TSGM được chứa trong chai duran, mỗi chai 100ml. Dùng micropipet cho vào hai môi trường trên, mỗi môi trường 1ml canh khuẩn *S. aureus* đã tăng sinh trong TSB (18-24 giờ) ủ ở 37°C.

c) Khảo sát đậm độ *S. aureus* theo thời gian

■ Mẫu trong môi trường BHI

Tiến hành lấy mẫu (canh khuẩn) trong các môi trường BHI ở các thời điểm 0, 16, 24, 48 và 72 giờ, gồm các bước sau:

• Bước 1:

Pha loãng mẫu thành các dãy thập phân 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ,.... Dùng micropipet hút 1ml mẫu trong môi trường BHI cho vào 9 ml pepton đệm để được độ pha loãng 10^{-1} , trộn đều bằng cách lắc mạnh hoặc vortex. Hút 1ml ở dung dịch 10^{-1} cho vào 9 ml pepton đệm để thu được độ pha loãng 10^{-2} . Cứ tiếp tục như vậy đến khi đạt được độ pha loãng mong muốn. Thay đầu tip vô trùng ở mỗi độ pha loãng.

• Bước 2: Trãi mẫu trên môi trường MSA

Hút 0,1ml dung dịch đã pha loãng cho lên môi trường MSA, dùng que trang trái đều, để khô, lật ngược đĩa, ủ ở 37°C trong 24 - 48 giờ.

- Bước 3: Đọc kết quả

Sau khi ủ 37°C trong 24 - 48 giờ, đếm các khuẩn lạc đặc trưng của *S. aureus* trên MSA. Trên MSA, *S. aureus* cho khuẩn lạc tròn, bờ đều và lõm, màu vàng nhạt đến vàng đậm và làm vàng môi trường xung quanh khuẩn lạc.

Công thức tính:

Mật độ (cfu/ml) = N/Vf

Trong đó: N: số khuẩn lạc đếm được.

V: thể tích trái (ml).

F: độ pha loãng.

Số liệu các khuẩn lạc được chuyển thành dạng logarithms (log10).

- Mẫu trong môi trường TSGM:

Tiến hành lấy mẫu (canh khuẩn) trong các môi trường TSGM ở các thời điểm 0, 16, 24, 48 và 72 giờ (thực hiện các bước giống như đối với mẫu trên môi trường BHI).

3.3.2.3. Xác định độc tố ruột enterotoxin bằng kỹ thuật ELISA

Sử dụng bộ kit và thường qui kiểm tra độc tố ruột của Tecra để xác định độc tố của từng chủng *S. aureus* ở các thời điểm 16, 24, 48 và 72 giờ. Phản ứng ELISA được thực hiện dựa trên kỹ thuật “sandwich”. Đây là sản phẩm đầu tiên được chứng nhận bởi AOAC và là bộ kit được dùng rộng rãi ở Mỹ (K. Robinson và ctv, 2000; Trần Linh Thuớc, 2002).

Nguyên tắc: phát hiện độc tố dựa trên thử nghiệm miễn dịch enzyme (enzyme immunoassay – EIA) dựa vào sự bắt cặp giữa các kháng thể với các độc tố (A-E) do sự phù hợp về cấu trúc. Các độc tố SE có trong mẫu sẽ gắn với kháng thể đã được phủ trên bề mặt giếng. Những vật liệu khác trong mẫu sẽ được rửa sạch. Sau đó, cho cộng hợp enzyme-kháng thể chuyên biệt của các độc tố SE vào. Rửa giếng, thêm cơ chất đặc hiệu của enzyme vào (ở đây sử dụng enzyme là horseradish peroxidase), enzyme xúc tác phản ứng thủy phân làm đổi màu cơ chất tạo sản phẩm màu xanh.

a) Chuẩn bị độc tố

Lấy 2ml mẫu trong môi trường BHI và TSGM cho vào eppendoff, ly tâm 6000 vòng trong 10 phút. Lấy dịch nổi, hiệu chỉnh pH = 7-8. Cho 50µl sample additive vào 1ml dịch nổi thu được, trộn đều.

b) Chuẩn bị thuốc thử

* Dung dịch rửa: pha loãng dung dịch rửa cô đặc cho vừa đủ 2 lít nước cất, bảo quản ở 4°C.

* Cộng hợp:

Hoàn nguyên lọ pha loãng vào lọ “conjugate”. Thay nắp đỏ và đóng nắp bảo quản. để cho cộng hợp tan hoàn toàn ở nhiệt độ phòng.

Chú ý: không lắc mạnh lọ, ghi ngày pha loãng vào lọ và thời gian bảo quản 1 tháng.

* Cơ chất:

Hoàn nguyên dung dịch pha loãng vào lọ “substrate”. Cho tan hoàn toàn. Cơ chất sau khi hoàn nguyên sẽ chuyển từ không màu đến màu xanh.

* Dung dịch dừng phản ứng và chất thêm vào mẫu: đã pha sẵn.

* Chứng độc tố (+):

Thêm 50 µl chứng độc tố (+) vào 4,95 ml dung dịch rửa (theo tỉ lệ 1:100) trong ống polypropylen. Sau khi pha xong phải dùng ngay, phần độc tố đã pha loãng nhưng không dùng hết phải được bỏ cẩn thận trong dung dịch sodium hypochloride 2%. Để tránh bị nhiễm, nên lấy 50 ml dung dịch rửa để riêng chỉ dành cho pha chứng dương.

* Chứng (-): không cần pha loãng.

c) Thực hiện

○ Bước 1: Chuẩn bị giếng mẫu

Để bộ kit ở nhiệt độ phòng (20-25°C) trước khi dùng. Mở gói và lấy số giếng cần thiết, mỗi giếng cho 1 mẫu, dùng 1 giếng cho chứng (+) và một cho chứng (-). Đặt giếng vào vỉ, cho các giếng không sử dụng vào túi, đóng gói lại.

○ Bước 2: Ngâm giếng

Đổ đầy dung dịch rửa vào các giếng, để 10 phút ở nhiệt độ phòng (20-25°C). Đổ bỏ dung dịch rửa, làm khô đĩa bằng cách lật ngược vỉ và đập bề mặt vỉ vào giấy thấm nhiều lần để loại bỏ những giọt còn sót lại.

- Bước 3: Thêm mẫu vào

Dùng một đầu tip cho mỗi mẫu. Hút 200 µl các mẫu và đổ chúng vào các giếng riêng biệt, đánh dấu vị trí của mỗi mẫu trên giấy ghi kết quả. Đậy các giếng bằng film dán và ủ ở 37°C trong 2 giờ.

- Bước 4: Rửa lần 1

Có thể rửa bằng tay hoặc bằng máy rửa tự động (rửa 4 lần).

+ Rửa bằng tay: Ấn chặt các giếng vào phiến để đảm bảo giếng không rơi khỏi phiến trong lúc rửa. Nhanh chóng lật ngược phiến, đổ tất cả dung dịch trong giếng vào bình có chứa dung dịch sodium hipochloride 2%. Sau đó làm khô giếng bằng cách vỗ mạnh giếng trên giấy thấm để loại bỏ các giọt còn sót lại. Cho dung dịch rửa vào đầy các giếng. dùng chai nắp vặn có vòi bơm, bơm dung dịch rửa mạnh vào các giếng, cẩn thận không để bọt khí ở đáy giếng. Rửa và làm sạch giếng 4 lần theo các bước như trên.

+ Rửa bằng máy: để có kết quả chính xác, máy rửa cần phải có chương trình cài đặt của TECRA VIA.

- Bước 5: Thêm cộng hợp

Đảm bảo giếng phải hoàn toàn khô trước khi thêm cộng hợp.

Thêm 200 µl cộng hợp vào mỗi giếng. Đậy giếng bằng giấy film và ủ ở nhiệt độ phòng (20-25°C) trong 1 giờ.

- Bước 6: Rửa lần 2

Thực hiện tương tự như bước 4, nhưng số lần rửa là 5 lần (không phải 4 lần).

- Bước 7: Thêm cơ chất

Đảm bảo các giếng phải hoàn toàn khô trước khi thực hiện. Thêm 200 µl cơ chất vào mỗi giếng. Ủ ở nhiệt độ phòng (20-25°C) trong 30 phút. Tránh để giếng ở gần máy điều hòa nhiệt độ hoặc ở những nơi có nhiệt độ dao động. Màu được tạo xung quanh thành giếng, gõ nhẹ vỉ để màu đều trước khi đọc kết quả. Ủ ít nhất 30 phút trước khi đọc kết quả.

Kết quả có thể được đọc bằng bảng so màu hoặc bằng máy đọc màu. Ở phương pháp này được đọc kết quả bằng máy đọc màu. Đọc kết quả tại thời điểm 30 phút khi chúng (+) đạt giá trị OD là 1. Chi kéo dài thời gian ủ sau 30 phút khi OD chúng (+) chưa đạt đến 1.

- Bước 8: Đọc kết quả

Sử dụng máy đọc màu, dùng bước sóng đơn: $414 \pm 10 \text{ nm}$, bước sóng đôi: $490 \pm 10 \text{ nm}$.

Sau 30 phút, nếu chứng (+) đạt $OD = 1,0$ thì chuyển sang bước 9 và 10. Trường hợp chứng (+) chưa đạt đến $OD = 1,0$ thì tiếp tục ủ cho đến khi chứng (+) đạt $OD = 1,0$ và tiếp tục bước 9 và 10.

Nếu như giá trị OD của chứng (+) vẫn chưa đạt đến 1,0 sau 45 phút thì không sử dụng kết quả này. Nên xem lại hướng dẫn trước khi làm lại thí nghiệm.

- Bước 9: Thêm dung dịch dừng phản ứng

Tùy lựa chọn có thể thêm hay không thêm chất dừng phản ứng nhưng chỉ nên thêm khi không đọc ngay kết quả được. Dung dịch dừng phản ứng sẽ làm chậm phản ứng lại, khi đó nên đọc kết quả trong vòng 30 phút sau khi thêm chất dừng phản ứng.

Thêm 20 μl dung dịch dừng phản ứng vào mỗi giếng, gõ nhẹ để trộn đều, sau đó đọc kết quả trong vòng 30 phút.

- Bước 10: Giải thích kết quả

Thử nghiệm có giá trị khi: chứng (+) đạt ít nhất $OD = 1,0$ và chứng (-) có $OD < 0,2$.

Nếu tiêu chuẩn trên không đạt thì kết quả này không được dùng, xem lại hướng dẫn trước khi làm lại thí nghiệm.

Một mẫu được xem là âm tính (-) khi thử nghiệm có giá trị và giếng mẫu có $OD < 0,2$.

Một mẫu được xem là dương tính (+) khi thử nghiệm có giá trị và giếng mẫu có $OD \geq 0,2$.

- Bước 11: Xác định loại độc tố (A, B, C, D, E)

Dùng bộ kit TECRA SET ID để xác định loại độc tố của các mẫu dương tính.

- Tiến trình được thực hiện tương tự các bước 1-8 đối với các mẫu tạo độc tố có kết quả dương tính đã được xác định ở trên, nhưng ở đây sử dụng bộ kit đơn giá, mỗi mẫu sử dụng 1 dãy gồm 5 giếng được gắn các kháng thể khác nhau (từ A đến E), mỗi giếng 200 μl độc tố. Trong đó:

- + SEA: giếng màu đen
- + SEB: giếng màu xanh
- + SEC: giếng màu vàng
- + SED: giếng màu đỏ
- + SEE: giếng màu trắng
- **Độc kết quả:**

Thử nghiệm có giá trị khi: chứng (+) đạt ít nhất OD = 1,0 và chứng (-) có OD < 0,2.

Nếu tiêu chuẩn trên không đạt thì kết quả này không được dùng, xem lại hướng dẫn trước khi làm lại thí nghiệm.

Kết quả đọc là dương tính (+) khi thử nghiệm có giá trị và giếng mẫu có OD \geq 0,2.

Kết quả đọc là âm tính (-) khi thử nghiệm có giá trị và giếng mẫu có OD < 0,2.

Như vậy, một độc tố được xem là thuộc type A, B, C, D hay E khi kết quả đọc của giếng tương ứng là dương tính (khi thử nghiệm có giá trị và giếng tương ứng có OD \geq 0,2).

○ **Bước 12:** Dọn dẹp sau thí nghiệm

Khi đã hoàn thành thử nghiệm, loại bỏ tất cả các độc tố trong mẫu thí nghiệm, kể cả chứng dương vào dung dịch sodium hypochlorite 2%. Ngâm tất cả các giếng đã sử dụng trong dung dịch sodium hypochlorite 2%, sau đó hấp tiệt trùng ở 121°C trong ít nhất 30 phút. Những thành phần khác của bộ kit và các giếng có thể tái sử dụng tùy theo điều kiện, qui định của phòng thí nghiệm.

* **Chú ý:**

+ Lưu ý hạn dùng của bộ kit. Chuẩn bị chất thử cẩn thận và ghi lại ngày mở trên nhãn. Sử dụng bộ kit trong vòng 56 ngày. Giữ lạnh tất cả các thành phần (2-8°C) khi không sử dụng. Tuyệt đối không để trong tủ đông.

- + Không làm lẫn lộn giữa các thuốc thử khác nhau.
- + Sử dụng đầu tip mới cho mỗi mẫu.
- + Mỗi thí nghiệm phải có chứng (+), chứng (-).
- + Các giếng chưa sử dụng phải cho vào gói và bịt kín lại.



Hình 3.2. Bộ kit Tecra xác định SE (SETVIA96)



Hình 3.3. Bộ kit Tecra phân loại SE (SIDVIA72)

PHẦN 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Kiểm tra độ sống và độ thuần của các chủng *S. aureus*

Các chủng *S. aureus* có nguồn gốc từ các mẫu thực phẩm và bệnh phẩm (Bảng 4.1) được kiểm tra độ sống và độ thuần bằng cách quan sát hình thái khuẩn lạc trên môi trường BP, môi trường MSA, nhuộm gram, thử phản ứng catalase và phản ứng coagulase.

Bảng 4.1. Nguồn gốc các chủng *S. aureus*

STT	Mã số mẫu	Nguồn gốc
1	M168	Phân
2	N88/05	Kẹo dừa đậu phộng
3	H110	Bánh ngọt
4	72/NĐ	Cá ngừ kho
5	H117	Bánh bò
6	B9	Heo quay
7	N76/05	Bánh bông lan kem
8	M156	Phân
9	M69	Phân
10	V30	Thịt nguội
11	G147/05	Cơm dừa cuốn
12	D2/06	Socola
13	Na1	Sữa
14	V29	Bánh mì thịt
15	G168/05	Bột trộn bánh bao
16	M73 BVND05	Phân
17	V25	Bì tôm chả lụa chay
18	Na5	Sữa
19	D1/06	Cà phê hòa tan
20	B118/06	Bông lan kem
21	D6/06	Kem socola
22	D11/06	Sữa chua
23	K17/ĐT	Ốt bằm
24	V13/ĐT	Phèo heo
25	V14/ĐT	Lòng gà
26	V15/ĐT	Lòng gà
27	Tss/GS	Chả lụa
28	Tpp/GS	Chả lụa
29	Tkk/GS	Chả lụa
30	V28/ĐT	Lòng heo
31	V29/ĐT	Lòng vịt
32	M64 BVND05	Phân
33	V34/ĐT	Pate
34	V35/ĐT	Chả lụa
35	V36/ĐT	Chả lụa

36	E2/NĐ06	Chất ói (mẫu ngộ độc)
----	---------	-----------------------

Cả 36 chủng được kiểm tra (100%) đều cho phản ứng catalase dương tính, phản ứng coagulase dương tính và tạo khuẩn lạc đặc trưng của *S. aureus* trên môi trường BP và MSA.

○ Trên môi trường BP, khuẩn lạc đặc trưng của *S. aureus* có màu đen nhánh, bóng, lồi, đường kính 1-1,5 mm, quanh khuẩn lạc có vòng sáng rộng 2–5 mm trên môi trường đục (Hình 4.1).

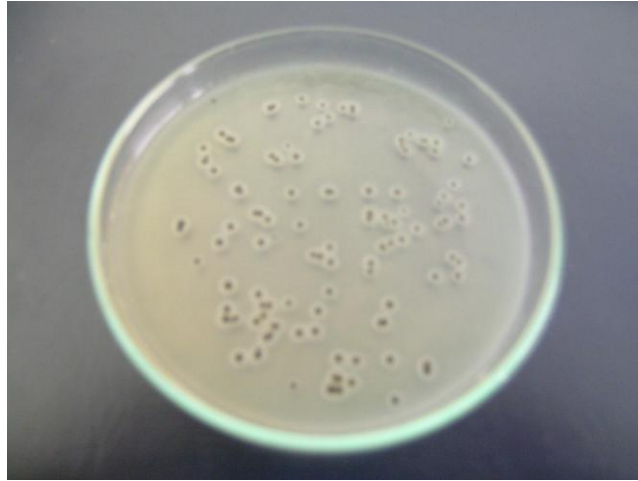
○ Trên môi trường MSA, khuẩn lạc tròn, bờ đều và lồi, màu vàng nhạt đến vàng đậm, làm vàng môi trường xung quanh khuẩn lạc (Hình 4.2).

Bảng 4.2. Tỷ lệ nguồn gốc các chủng *S. aureus*

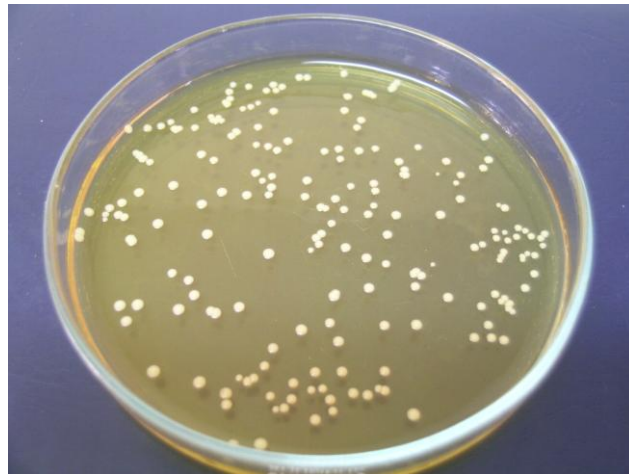
STT	Nguồn gốc chủng	Số lượng	Tỷ lệ
1	Mẫu thực phẩm từ thịt, cá	15	41,7%
2	Mẫu thực phẩm từ bánh, kẹo	6	16,7%
3	Mẫu thực phẩm từ sữa	3	8,3%
4	Mẫu phân	5	13,9%
5	Mẫu từ chất ói	1	2,8%
6	Mẫu thực phẩm khác	6	16,7%

36 chủng trên có nguồn gốc từ các mẫu thực phẩm và bệnh phẩm. Trong đó, các mẫu thực phẩm từ thịt, cá chiếm tỷ lệ cao nhất (41,6%) trong các mẫu thực phẩm bị nhiễm *S. aureus* (Bảng 4.2 và Hình 4.3). Kết quả này khá phù hợp với các cuộc khảo sát về vệ sinh an toàn thực phẩm thức ăn đường phố trước đây. Các mẫu phân (13,9%) và chất ói (2,8%) là các mẫu bệnh phẩm được lấy từ bệnh nhân có triệu chứng ngộ độc *S. aureus*.

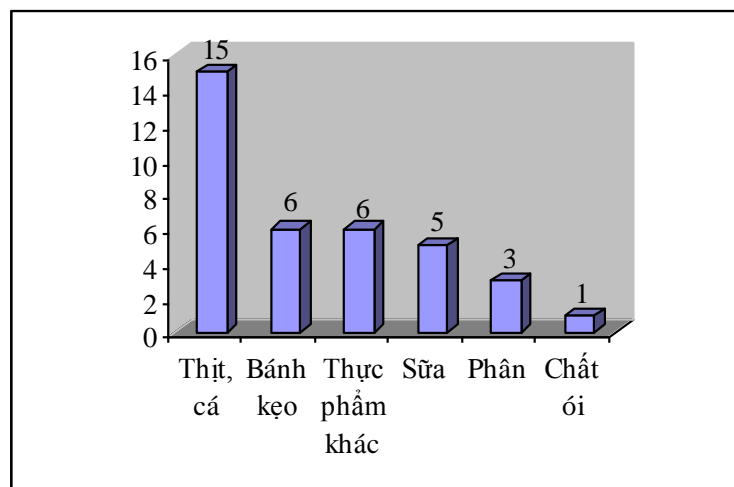
Như vậy với kết quả trên cho thấy các chủng này vẫn còn sống và vẫn đảm bảo độ thuần có thể sử dụng để tiến hành thí nghiệm.



Hình 4.1. Khuẩn lạc *S. aureus* trên môi trường Baird Paker



Hình 4.2. Khuẩn lạc *S. aureus* trên môi trường MSA



Hình 4.3. Nguồn gốc các chủng *S. aureus*

4.2. Khảo sát đậm độ và khả năng sinh độc tố của các chủng *S. aureus*

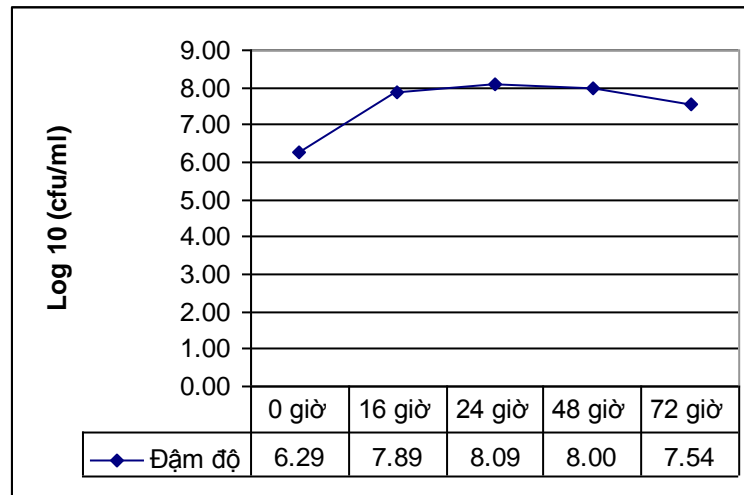
4.2.1. Đậm độ

4.2.1.1. Trên môi trường TSGM

Bảng 4.3. Đậm độ và khả năng sinh độc tố của *S. aureus* trên môi trường TSGM

S T T	Mã số chủng	0 giờ	16 giờ		24 giờ		48 giờ		72 giờ		Kết quả
		Đậm độ (log10)	Đậm độ (log10)	Độc tố (OD)	Đậm độ (log10)	Độc tố (OD)	Đậm độ (log10)	Độc tố (OD)	Đậm độ (log10)	Độc tố (OD)	
1	M168	5.97	7.68	1.861	7.91	2.430	8.18	2.672	7.88	2.676	+
2	N88/05	5.91	6.85	0.204	7.23	0.223	7.30	0.235	6.98	0.340	+
3	H110	6.45	7.15	0.033	7.48	0.047	7.18	0.068	6.60	0.077	-
4	72/NĐ	5.98	8.32	0.112	8.78	0.128	8.67	0.094	8.36	0.085	-
5	H117	6.08	8.11	0.091	8.26	0.125	8.45	0.143	7.90	0.152	-
6	B9	6.49	8.23	0.112	8.48	0.135	8.78	0.147	8.34	0.158	-
7	N76/05	6.26	7.79	0.096	7.65	1.118	8.23	0.131	7.97	0.146	-
8	M156	6.48	7.89	1.542	7.91	2.826	8.26	3.600	7.79	3.675	+
9	M69	6.38	7.15	2.504	7.66	3.310	8.32	3.323	8.15	3.320	+
10	V30	6.30	8.46	1.872	8.45	2.502	8.30	2.645	8.04	2.660	+
11	G147/05	5.86	8.28	0.512	8.45	0.621	8.04	0.729	7.81	0.850	+
12	D2/06	6.04	7.74	0.081	7.83	0.097	8.76	0.118	7.54	0.116	-
13	Na1	6.51	8.46	0.073	8.53	0.084	8.45	0.092	8.26	0.095	-
14	V29	6.26	6.95	1.520	8.15	1.986	7.40	2.206	6.78	2.371	+
15	G168/05	4.78	6.48	0.064	7.41	0.072	7.40	0.081	7.36	0.086	-
16	M73 BVND05	5.94	8.26	1.703	8.59	1.882	8.38	2.504	8.08	2.701	+
17	V25	5.84	8.32	0.135	7.98	0.179	7.76	0.185	6.85	0.189	-
18	Na5	6.28	8.80	0.064	8.84	0.081	8.41	0.092	8.36	0.099	-
19	D1/06	5.91	7.62	0.074	7.56	0.082	7.53	0.091	6.93	0.090	-
20	B118/06	6.18	7.26	0.071	7.79	0.080	7.28	0.089	6.84	0.092	-
21	D6/06	6.48	8.46	0.124	8.26	0.153	8.00	0.162	7.76	0.169	-
22	D11/06	6.66	8.00	0.112	8.15	0.146	7.92	0.158	7.68	0.161	-
23	K17/ĐT	5.73	7.20	0.125	7.40	0.139	7.28	0.145	6.83	0.152	-
24	V13/ĐT	5.74	7.75	0.119	7.61	0.128	7.20	0.136	6.89	0.141	-
25	V14/ĐT	6.18	7.71	0.153	8.34	0.165	7.94	0.171	7.18	0.172	-
26	V15/ĐT	6.48	8.74	0.102	8.66	0.119	8.53	0.125	8.18	0.130	-
27	Tss/GS	7.72	7.83	0.135	7.72	0.149	7.61	0.158	7.28	0.163	-
28	Tpp/GS	7.84	7.62	0.132	7.82	0.148	7.92	0.152	7.46	0.159	-
29	Tkk/GS	7.72	8.76	0.321	8.82	0.457	9.08	0.553	8.15	0.500	+
30	V28/ĐT	6.11	7.90	0.144	7.97	0.159	7.73	0.165	7.60	0.170	-
31	V29/ĐT	6.30	7.75	0.119	8.38	0.134	8.15	0.145	7.92	0.151	-
32	M64 BVND05	5.78	7.28	0.106	6.90	0.112	6.85	0.121	6.26	0.120	-
33	V34/ĐT	6.43	8.41	0.095	8.48	0.109	8.86	0.116	7.32	0.119	-
34	V35/ĐT	6.41	8.40	0.097	8.72	0.112	8.76	0.126	8.43	0.125	-
35	V36/ĐT	6.62	8.08	0.103	8.48	0.125	6.90	0.137	5.43	0.142	-
36	E2/NĐ06	6.18	8.30	2.604	8.53	2.990	8.32	3.560	8.08	3.670	+

Ghi chú: Mẫu (+) có giá trị OD \geq 0,2.



Hình 4.4. Sự phát triển của *S. aureus* trên môi trường TSGM

Trên môi trường TSGM, đậm độ trung bình của *S. aureus* ở các thời điểm 0, 16, 24, 48 và 72 giờ lần lượt là 6,29; 7,89; 8,09; 8,00 và 7,54 log₁₀ (cfu/ml). Đậm độ trung bình thấp nhất là 6,29 log₁₀(cfu/ml) ở 0 giờ và cao nhất là 8,09 log₁₀ (cfu/ml) ở 24 giờ. Theo hình 4.4, sự phát triển của *S. aureus* tuân theo đường cong tăng trưởng của vi khuẩn, gồm các phase: phase chậm, phase tăng trưởng cấp số, phase dừng và phase suy vong. Nhưng ở đây ta chỉ thấy được 3 phase: phase cấp số, phase dừng và phase suy vong, không thấy phase chậm và chỉ thấy được giai đoạn đầu của phase suy vong. Điều này là do trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành khảo sát đậm độ *S. aureus* ở các thời điểm 0, 16, 24, 48 và 72 giờ, không khảo sát các thời điểm trong khoảng thời gian từ 0 - 16 giờ cũng như sau 72 giờ.

4.2.1.2. Trên môi trường BHI

Tương tự như trên môi trường TSGM, ở thí nghiệm trên môi trường BHI, đường cong tăng trưởng của *S. aureus* cũng theo đường cong tăng trưởng của vi khuẩn nhưng chỉ thấy được 3 phase: phase cấp số, phase dừng và phase suy vong; không thấy phase chậm (Hình 4.5).

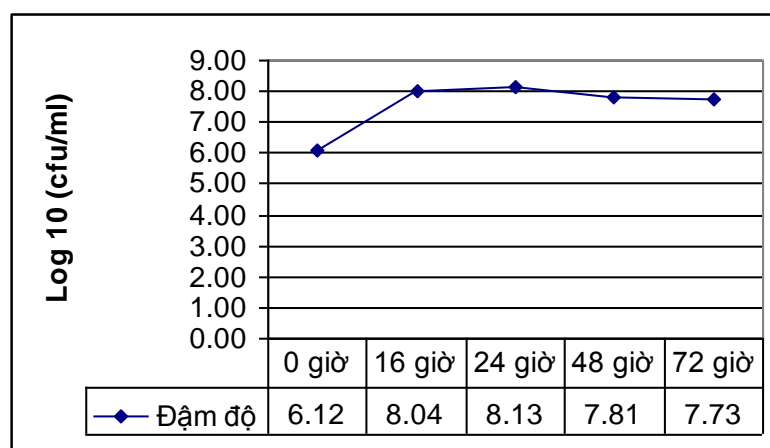
Đậm độ trung bình của *S. aureus* ở các thời điểm 0, 16, 24, 48 và 72 giờ lần lượt là 6,12; 8,04; 8,13; 7,81 và 7,73 log₁₀ (cfu/ml). Đậm độ trung bình thấp nhất là 6,12 log₁₀ (cfu/ml) ở 0 giờ và cao nhất là 8,13 log₁₀ (cfu/ml) ở 24 giờ.

ST	Mã số	0 giờ	16 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ	Kết
----	-------	-------	--------	--------	--------	--------	-----

		Đậm độ (log10)	Đậm độ (log10)	Độc tố (OD)	Đậm độ (log10)	Độc tố (OD)	Đậm độ (log10)	Độc tố (OD)	Đậm độ (log10)	Độc tố (OD)	
1	M168	5.93	7.53	2.313	7.64	2.378	7.81	2.393	7.71	2.623	+
2	N88/05	6.04	7.20	1.020	7.40	1.321	7.66	1.458	7.64	1.620	+
3	H110	6.52	7.08	0.029	7.08	0.041	6.85	0.063	6.00	0.072	-
4	72/NĐ	5.59	7.70	0.117	7.93	0.110	8.11	0.083	8.11	0.079	-
5	H117	5.87	8.04	0.095	8.00	0.131	7.72	0.149	8.62	0.154	-
6	B9	6.36	8.15	0.122	8.18	0.138	7.94	0.143	8.11	0.152	-
7	N76/05	6.11	7.59	0.103	7.91	1.112	7.63	0.124	7.80	0.132	-
8	M156	6.38	8.26	1.212	8.28	1.357	8.23	2.021	7.98	2.322	+
9	M69	6.15	8.23	1.856	8.20	2.560	8.15	2.968	7.70	2.970	+
10	V30	6.38	8.48	1.852	8.45	3.012	7.70	3.239	7.32	3.307	+
11	G147/05	5.76	8.26	0.526	8.26	1.010	7.72	1.202	7.70	1.376	+
12	D2/06	5.88	7.85	0.088	7.90	0.102	7.72	0.121	7.72	0.127	-
13	Na1	6.52	8.46	0.065	8.46	0.072	8.26	0.083	7.89	0.089	-
14	V29	6.15	8.00	1.500	7.97	2.021	8.04	2.156	7.79	2.370	+
15	G168/05	5.74	7.86	0.066	7.76	0.070	7.62	0.083	7.11	0.090	-
16	M73 BVND05	6.04	8.48	1.635	8.48	2.110	8.69	2.123	8.08	2.256	+
17	V25	5.83	7.23	0.139	7.59	0.156	7.60	0.175	7.56	0.183	-
18	Na5	6.18	8.34	0.056	8.78	0.075	7.91	0.094	8.00	0.098	-
19	D1/06	5.78	6.95	0.065	7.71	0.076	7.54	0.085	7.91	0.092	-
20	B118/06	6.08	8.20	0.063	8.91	0.071	7.91	0.082	7.74	0.087	-
21	D6/06	6.58	8.80	0.135	8.52	0.159	7.66	0.170	7.85	0.176	-
22	D11/06	6.76	7.87	0.103	7.87	0.125	7.67	0.144	7.86	0.154	-
23	K17/ĐT	5.75	7.79	0.127	7.88	0.138	8.04	0.147	7.96	0.150	-
24	V13/ĐT	5.85	7.61	0.113	7.68	0.125	7.36	0.132	8.15	0.139	-
25	V14/ĐT	6.18	8.69	0.149	8.70	0.162	7.86	0.170	8.08	0.173	-
26	V15/ĐT	6.38	8.64	0.122	8.72	0.131	7.80	0.140	8.20	0.146	-
27	Tss/GS	6.08	7.96	0.124	8.04	0.137	7.98	0.144	7.68	0.156	-
28	Tpp/GS	5.88	8.28	0.130	8.30	0.142	7.63	0.149	7.76	0.155	-
29	Tkk/GS	5.91	8.36	0.210	8.43	0.675	7.23	0.748	7.23	0.750	+
30	V28/ĐT	6.18	7.97	0.136	8.23	0.142	8.20	0.151	8.11	0.159	-
31	V29/ĐT	6.23	8.20	0.128	8.20	0.139	8.04	0.151	8.04	0.153	-
32	M64 BVND05	5.59	7.89	0.123	7.90	0.138	7.38	0.145	7.26	0.151	-
33	V34/ĐT	6.36	8.58	0.126	8.66	0.139	8.40	0.150	8.08	0.157	-
34	V35/ĐT	6.34	8.48	0.114	8.62	0.127	8.41	0.133	8.53	0.139	-
35	V36/ĐT	6.62	7.98	0.109	7.62	0.118	6.60	0.131	5.15	0.139	-
36	E2/NĐ06	6.38	8.46	2.250	8.58	2.476	7.94	2.505	7.86	3.010	+

Bảng 4.4. Đậm độ và khả năng sinh độc tố của các chủng *S. aureus* trên môi trường BHI

Ghi chú: Mẫu (+) có giá trị OD \geq 0,2



Hình 4.5. Sự phát triển của *S. aureus* trên môi trường BHI

Như vậy trên cả hai môi trường, sự phát triển của *S. aureus* theo đường cong phát triển của vi khuẩn, đậm độ đạt cao nhất ở 24 giờ. Tuy nhiên, không thấy được phase chậm do chưa khảo sát ở các thời điểm trong khoảng 0 - 16 giờ, có thể phase chậm xảy ra ở các thời điểm trong khoảng thời gian này.

4.2.2. Khả năng sinh độc tố

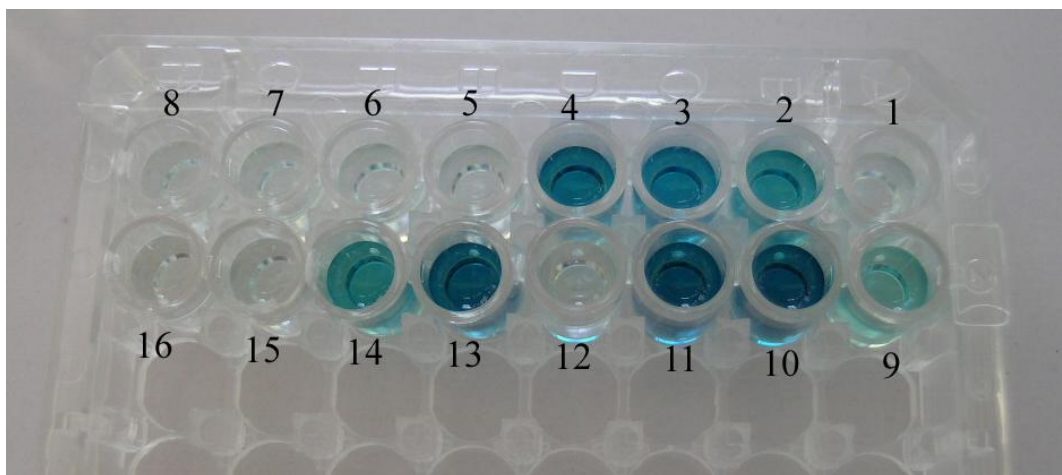
Khả năng sinh độc tố của các chủng *S. aureus* được xác định bằng phương pháp ELISA. Thử nghiệm có giá trị khi: chứng (+) đạt ít nhất OD = 1,0 và chứng (-) có OD < 0,2. Qua 7 lần thực hiện phản ứng ELISA cho thấy bộ kit TECRA xác định độc tố SE có giá trị OD của đối chứng đều nằm trong giới hạn cho phép (Bảng 4.5).

Bảng 4.5. Giá trị OD của đối chứng âm và đối chứng dương

Lần thực hiện	Đối chứng âm	Đối chứng dương	Kết luận
1	0.083	1.187	Đạt
2	0.134	1.637	Đạt
3	0.063	1.393	Đạt
4	0.121	1.224	Đạt
5	0.114	1.029	Đạt
6	0.080	1.020	Đạt
7	0.087	1.030	Đạt
Trung bình	0,097 ± 0,026	1,217 ± 0, 230	Đạt

- Đối chứng âm (-): giá trị OD = 0,097 < 0,2).
- Đối chứng dương (+): giá trị OD = 1,217 ≥ 1).

Như vậy, các đối chứng dương và đối chứng âm của bộ kit qua các lần thực hiện ELISA xác định độc tố SE đều đạt tiêu chuẩn. Chúng được xem là dương tính (+) khi giá trị OD $\geq 0,2$; chủng âm tính khi giá trị OD $< 0,2$ (Hình 4.6).



Hình 4.6. Phản ứng ELISA xác định độc tố ruột enterotoxin

<i>Giếng 1: đối chứng âm (-)</i>	<i>Giếng 9: G147/ Tecra / 48 giờ (+)</i>
<i>Giếng 2: đối chứng dương (+)</i>	<i>Giếng 10: M69/ Tecra / 48 giờ (+)</i>
<i>Giếng 3: M156/ Tecra/ 48 giờ (+)</i>	<i>Giếng 11: V30/ BHI / 48 giờ (+)</i>
<i>Giếng 4: V30/ Tecra/ 48 giờ (+)</i>	<i>Giếng 12: H117/ BHI / 48 giờ (-)</i>
<i>Giếng 5: N76/ Tecra / 48 giờ (-)</i>	<i>Giếng 13: M69/ BHI (48 giờ) (+)</i>
<i>Giếng 6: B9/ Tecra / 48 giờ (-)</i>	<i>Giếng 14: N88/ BHI (48 giờ) (+)</i>
<i>Giếng 7: H117/ Tecra / 48 giờ (-)</i>	<i>Giếng 15: B9/ BHI (48 giờ) (-)</i>
<i>Giếng 8: 72/NĐ/ Tecra / 48 giờ (-)</i>	<i>Giếng 16: N76/ BHI (48 giờ) (-)</i>

Trong 36 chủng được khảo sát, có 10 chủng (27,8%) tạo độc tố cả trên môi trường TSGM và BHI (giá trị OD $\geq 0,2$). Trong đó chiếm tỉ lệ cao nhất là các chủng từ các mẫu bệnh phẩm (50%) (Bảng 4.6). Đây là các chủng lấy từ phân và chất ói của người bị ngộ độc, có giá trị OD rất cao (OD > 1). Riêng chủng từ chất ói có giá trị OD cao nhất (OD = 3,670 ở 72 giờ).

Như vậy, không phải tất cả các chủng *S. aureus* đều tạo độc tố enterotoxin, chỉ một số chủng có khả năng tạo độc tố. Trong đó các chủng có nguồn gốc từ bệnh phẩm tạo lượng độc tố rất cao so với các chủng có nguồn gốc từ thực phẩm.

Bảng 4.6: Nguồn gốc các chủng cho độc tố dương tính

STT	Mã số mẫu	Nguồn gốc	Độc tố (OD) ở 72 giờ
1	M168	Phân	2.676
2	N88/05	Kẹo dừa đậu phộng	0.340
3	M156	Phân	3.675
4	M69	Phân	3.320
5	V30	Thịt nguội	2.660
6	G147/05	Cơm dừa cuốn	0.850
7	V29	Bánh mì thịt	2.371
8	M73 BVND05	Phân	2.701
9	Tkk/GS	Chả lụa	0.500
10	E2/NĐ06	Chất ói (mẫu ngộ độc)	3.670

4.3. Khảo sát các chủng có khả năng sinh độc tố

4.3.1. Tương quan giữa đậm độ và khả năng tạo độc tố

Bảng 4.7. Các chủng *S. aureus* có khả năng tạo độc tố trên môi trường TSGM

STT	Mã số chủng	0 giờ	16 giờ		24 giờ		48 giờ		72 giờ	
		Đậm độ (log10)	Đậm độ (log10)	Độc tố (OD)	Đậm độ (log10)	Độc tố (OD)	Đậm độ (log10)	Độc tố (OD)	Đậm độ (log10)	Độc tố (OD)
1	M168	5.97	7.68	1.861	7.91	2.430	8.18	2.672	7.88	2.676
2	N88/05	5.91	6.85	0.204	7.23	0.223	7.30	0.235	6.98	0.340
3	M156	6.48	7.89	1.542	7.91	2.826	8.26	3.600	7.79	3.675
4	M69	6.38	7.15	2.504	7.66	3.310	8.32	3.323	8.15	3.320
5	V30	6.30	8.46	1.872	8.45	2.502	8.30	2.645	8.04	2.660
6	G147/05	5.86	8.28	0.512	8.45	0.621	8.04	0.729	7.81	0.850
7	V29	6.26	6.95	1.520	8.15	1.986	7.40	2.206	6.78	2.371
8	M73 BVND05	5.94	8.26	1.703	8.59	1.882	8.38	2.504	8.08	2.701
9	Tkk/GS	7.72	8.76	0.321	8.82	0.457	9.08	0.553	8.15	0.500
10	E2/NĐ06	6.18	8.30	2.604	8.53	2.990	8.32	3.560	8.08	3.670
Trung bình		6.30	7.86	1.464	8.17	1.923	8.16	2.203	7.77	2.276

Khi khảo sát đậm độ *S. aureus*, kết quả ở Phụ lục B.1 cho thấy có sự khác biệt về đậm độ *S. aureus* theo thời gian trên cả hai môi trường TSGM và BHI ($P = 0 < 0,05$), cụ thể là có sự khác biệt giữa các thời điểm 0-16 giờ, 0-24 giờ, 0-48 giờ, 0-72 giờ, 24-72 giờ, 48-72 giờ (Phụ lục B.2). Đó là do khi cho *S. aureus* vào môi trường nuôi cấy, đậm độ vi khuẩn sẽ tăng cao ở phase cấp số, cao nhất là ở 24 giờ (8,17 log₁₀ cfu/ml) trên cả hai môi trường TSGM và BHI; và hầu như không đổi ở

phase dừng lúc 48 giờ, sau đó sẽ giảm ở phase suy vong lúc 72 giờ (7,77 log₁₀ cfu/ml trên môi trường TSGM và 7,70 log₁₀ cfu/ml trên môi trường BHI). Tuy nhiên do thời điểm 72 giờ thuộc giai đoạn đầu của phase suy vong nên vẫn có sự khác biệt về đậm độ so với lúc 0 giờ (trên môi trường TSGM là 6,30 log₁₀ cfu/ml và trên môi trường BHI là 6,11 log₁₀ cfu/ml).

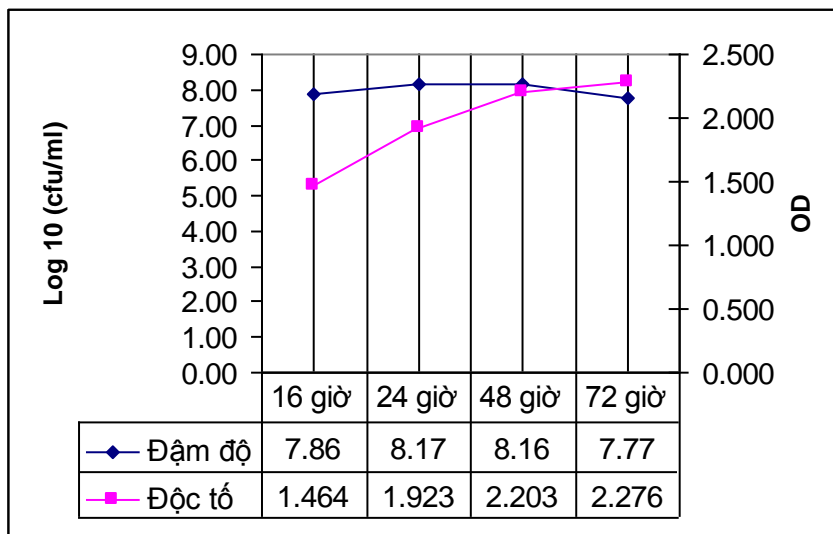
Bảng 4.8. Các chủng *S. aureus* có khả năng tạo độc tố trên môi trường BHI

STT	Mã số chủng	0 giờ	16 giờ		24 giờ		48 giờ		72 giờ	
		Đậm độ (log ₁₀)	Đậm độ (log ₁₀)	Độc tố (OD)	Đậm độ (log ₁₀)	Độc tố (OD)	Đậm độ (log ₁₀)	Độc tố (OD)	Đậm độ (log ₁₀)	Độc tố (OD)
1	M168	5.93	7.53	2.313	7.64	2.378	7.81	2.393	7.71	2.623
2	N88/05	6.04	7.20	1.020	7.40	1.321	7.66	1.458	7.64	1.620
3	M156	6.38	8.26	1.212	8.28	1.357	8.23	2.021	7.98	2.322
4	M69	6.15	8.23	1.856	8.20	2.560	8.15	2.968	7.70	2.970
5	V30	6.38	8.48	1.852	8.45	3.012	7.70	3.239	7.32	3.307
6	G147/05	5.76	8.26	0.526	8.26	1.010	7.72	1.202	7.70	1.376
7	V29	6.15	8.00	1.500	7.97	2.021	8.04	2.156	7.79	2.370
8	M73 BVND05	6.04	8.48	1.635	8.48	2.110	8.69	2.123	8.08	2.256
9	Tkk/GS	5.91	8.36	0.210	8.43	0.675	7.23	0.748	7.23	0.750
10	E2/ND06	6.38	8.46	2.250	8.58	2.476	7.94	2.505	7.86	3.010
Trung bình		6.11	8.13	1.437	8.17	1.892	7.92	2.081	7.70	2.260

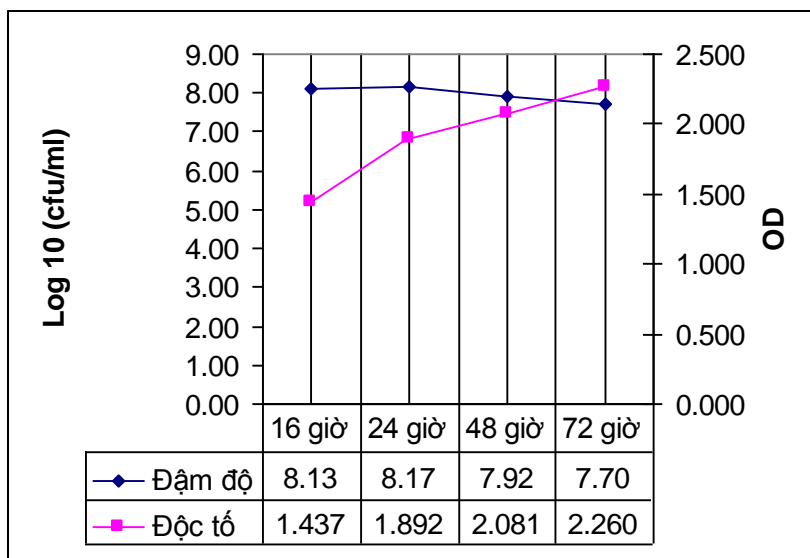
Về độc tố SE, có sự khác biệt theo thời gian trên cả hai môi trường TSGM và BHI ($P = 0,0387 < 0,05$), thể hiện rõ giữa các thời điểm 16–48 giờ, 16–72 giờ (Phụ lục B.4 và Phụ lục B.5). Trên môi trường TSGM, giá trị OD ở 16 giờ là 1,464; ở 24 giờ là 1,923; khá cao ở 48 giờ (2,203), cao nhất ở 72 giờ (2,276). Tương tự, trên môi trường BHI, giá trị OD của độc tố ở 16 giờ đạt 1,437; ở 24 giờ đạt 1,892; ở 48 giờ đạt 2,081 và cao nhất là ở 72 giờ (2.260). Qua đó cho thấy độc tố SE tăng theo thời gian, ngay cả khi đậm độ không đổi ở phase dừng và đậm độ giảm ở phase suy vong (Hình 4.7, Hình 4.8). Đồng thời, từ Phụ lục B.7, B.8 cho thấy hệ số tương quan giữa đậm độ và độc tố rất thấp và sự tương quan là không có ý nghĩa, trên môi trường BHI là 0,015 ($P = 0,928 > 0,05$), trên môi trường TSGM là 0,111 ($P = 0,495 > 0,05$).

Ở các nghiên cứu trước đây, khi thử nghiệm đậm độ và khả năng sinh độc tố của *S. aureus* trong sữa, Hiroshi Fujikawa và Satoshi Morozumi (2005) cũng thấy rằng khi đậm độ tế bào vi khuẩn đạt $10^{6,5}$ cfu/ml, lượng độc tố SEA tăng tuyến tính theo

thời gian, thậm chí vẫn tăng sau khi vi khuẩn đạt đến phase dừng. Như vậy, đậm độ và lượng độc tố *S. aureus* không tương quan nhau.



Hình 4.7. Đậm độ và khả năng sinh độc tố của *S. aureus* trên môi trường TSGM



Hình 4.8. Đậm độ và khả năng sinh độc tố của *S. aureus* trên môi trường BHI

Theo bảng 4.7, trên môi trường TSGM, ở thời điểm 16 giờ, đậm độ vi khuẩn *S. aureus* đạt 7,86 log₁₀ cfu/ml (10⁷ cfu/ml) thì khả năng sinh độc tố SE đạt giá trị OD là 1,923. Còn trên môi trường BHI, ở thời điểm 16 giờ, giá trị OD độc tố đạt 1,437 khi đậm độ vi khuẩn *S. aureus* đạt 8,13 log₁₀ (cfu/ml) (Bảng 4.8). Trong khi đó, khả năng tạo độc tố của *S. aureus* được xem là dương tính khi giá trị OD ≥ 0,2. Như vậy, lượng độc tố mà *S. aureus* tạo ra lúc 16 giờ là rất cao. Điều đó cho thấy có thể *S. aureus* bắt đầu tạo độc tố SE vào trước thời điểm 16 giờ, lúc đậm độ vi khuẩn thấp hơn 10⁷ cfu/ml. Trong các báo cáo trước đây, L.Simeão do Carmo (2002); Yves Le Loir và ctv (2003)

xác định rằng *S. aureus* có thể tạo SE khi đậm độ vi khuẩn đạt 10^6 cfu/ml. Còn trong nghiên cứu sự phát triển và tạo độc tố SE của *S. aureus* trong sữa, kết quả cho thấy khi đậm độ tế bào vi khuẩn đạt $10^{6,5}$ cfu/ml, lượng độc tố SEA tăng tuyến tính theo thời gian (Hiroshi Fujikawa và Satoshi Morozumi, 2005).

Tóm lại, trong 36 chủng *S. aureus* được khảo sát, chỉ có 10 chủng tạo độc tố SE (chiếm 27,8%). Như vậy, không phải tất cả các chủng *S. aureus* đều có khả năng tạo độc tố, việc tạo độc tố là tùy thuộc vào từng chủng. Ta cũng không thể dựa vào đậm độ vi khuẩn để suy ra lượng độc tố vì đậm độ và độc tố không tương quan với nhau. Đậm độ tuân theo đường cong tăng trưởng của vi khuẩn, tăng ở phase cấp số, không đổi ở phase dừng và giảm ở phase suy vong, còn độc tố thì tăng theo thời gian và đạt cao nhất ở 72 giờ. Đối với các chủng *S. aureus* có khả năng tạo độc tố thì ở thời điểm 16 giờ đã có thể tạo độc tố với giá trị OD khá cao (1,464 trên môi trường TSGM và 1,437 trên môi trường BHI).

Tuy nhiên, do điều kiện thí nghiệm còn hạn chế, chúng tôi chưa khảo sát được đậm độ và khả năng tạo độc tố của *S. aureus* ở thời điểm trước 16 giờ cũng như sau 72 giờ. Do đó không thấy được phase chậm, chưa xác định được trên môi trường nuôi cấy ở thời điểm trước 16 giờ, *S. aureus* có hay không có tạo độc tố, với lượng bao nhiêu, có đủ gây ngộ độc không, cũng như chưa xác định được sau 72 giờ lượng độc tố có tiếp tục tăng hay không. Do đó, cần tiến hành những thí nghiệm khảo sát đậm độ và độc tố *S. aureus* trước 16 giờ và sau 72 giờ, cũng như xác định liều lượng độc tố tương ứng với giá trị OD có thể gây độc.

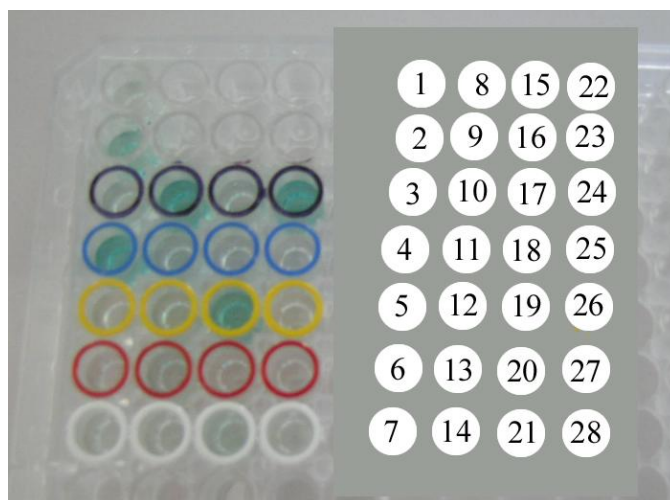
4.3.2. Đánh giá tác động của hai môi trường TSGM và BHI

Từ Phụ lục B.1 và Phụ lục B.3 cho thấy sự khác biệt về đậm độ của *S. aureus* trên hai môi trường TSGM và BHI là không có ý nghĩa ($P = 0,6146 > 0,05$), đồng thời cũng không có sự khác biệt về khả năng tạo độc tố trên hai môi trường này ($P = 0,7365 > 0,05$) (Phụ lục B.4 và Phụ lục B.6). Như vậy hai môi trường TSGM và BHI có tác động như nhau đến sự phát triển cũng như khả năng tạo độc tố của các chủng *S. aureus* ở cùng điều kiện nuôi cấy. Do đó có thể sử dụng môi trường BHI thay thế cho môi trường TSGM để nuôi cấy *S. aureus* và kiểm tra độc tố của chúng.

4.4. Xác định các loại độc tố SE

Các độc tố cần được xác định là A, B, C, D và E tương ứng với các giếng có màu đen, xanh, vàng, đỏ và trắng; khi ở giếng nào có giá trị OD $\geq 0,2$ thì được xác định là

nhóm độc tố tương ứng với giếng đó (Hình 4.9). Kết quả thí nghiệm cho thấy các chủng *S. aureus* này tạo các loại độc tố SEA, SEB, SEC, không có chủng nào tạo độc tố SED và SEE (Bảng 4.9).



Hình 4.9. Kết quả xác định loại độc tố bằng phương pháp ELISA

Giếng 1: đối chứng âm

Giếng 2: đối chứng dương

Giếng 3 – 7: Tkk/GS (serotype B - giếng 4)

Giếng 10 - 14: G147/05 (serotype A – giếng 10)

Giếng 17 - 21: E2/NĐ06 (serotype C - giếng 19)

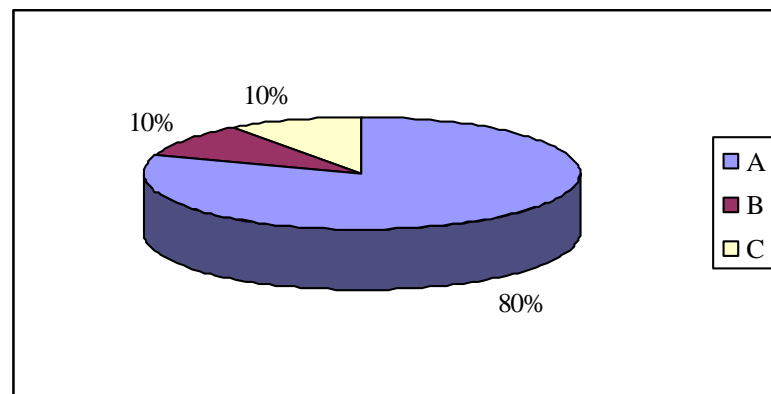
Giếng 24 - 28: V29 (serotype A – giếng 24)

Giếng 8 , 9, 15, 16, 22, 23: các giếng trống

Bảng 4.9. Các loại độc tố của *S. aureus*

STT	Mã số mẫu	Giá trị OD	Loại độc tố
1	M168	1.008	A
2	N88/05	0.375	A
3	M156	0.983	A
4	M69	1.020	A
5	V30	0.818	A
6	G147/05	0.425	A
7	V29	0.727	A
8	M73 BVND05	0.857	A
9	Tkk/GS	0.684	B
10	E2/NĐ06	0.674	C

Trong đó, SEA chiếm tỉ lệ cao nhất (80%), trong khi SEB (10%) và SEC (10%) (Hình 4.10). Kết quả này phù hợp với các báo cáo trước đây, SEA là loại độc tố thường gây ra các vụ ngộ độc thực phẩm do tụ cầu ở nhiều nước (Lenz W và ctv, 1983; H.Y. Tsen, 1996; Naomi Balaban và Avraham Rasooly, 2000; Capucine Letetre và ctv, 2003). Các dòng *S. aureus* tạo độc tố SEA có tần số cao nhất trong các mẫu thực phẩm (61,5%) và trên những người khỏe mạnh (53,6%). Ngoài ra, C. Vernozy-Rozand và ctv (2004) cũng nhận thấy rằng SEA là nguyên nhân của 75% các vụ ngộ độc do tụ cầu, tiếp đến là SED, SEC và SEB, còn các vụ dịch do SEE thường rất ít gặp.



Hình 4.10. Tỉ lệ các loại độc tố SE

PHẦN 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

◆ Trong 36 chủng *S. aureus* khảo sát, có 10 chủng có khả năng tạo độc tố (27,8%), trong đó các chủng từ mẫu bệnh phẩm chiếm tỉ lệ cao nhất (50%). Như vậy khả năng tạo độc tố SE của *S. aureus* là tùy thuộc vào từng chủng.

◆ Mật độ và độc tố *S. aureus* không tương quan với nhau, độc tố tăng theo thời gian.

◆ Sau 16 giờ nuôi cấy, trên môi trường TSGM, mật độ vi khuẩn đạt 7,86 log₁₀ cfu/ml thì độc tố đạt giá trị OD (ELISA) là 1,464. Trên môi trường BHI, mật độ vi khuẩn đạt 8,13 log₁₀ cfu/ml thì độc tố đạt giá trị OD (ELISA) là 1,437 (OD ≥ 0,2 là dương tính).

◆ Hai môi trường TSGM và BHI là như nhau về ảnh hưởng đến mật độ và khả năng tạo độc tố của *S. aureus*. Vì thế có thể sử dụng môi trường BHI thay thế môi trường TSGM trong công tác kiểm nghiệm phát hiện *S. aureus* cũng như độc tố SE của chúng.

◆ 10 chủng *S. aureus* này tạo các loại độc tố SEA, SEB, SEC; trong đó, SEA chiếm tỉ lệ cao nhất (80%), trong khi SEB (10%) và SEC (10%).

5.2. Đề nghị

Do hạn chế về thời gian và điều kiện thí nghiệm, chúng tôi thu được một số kết quả nhất định. Nếu có điều kiện, cần tiến hành:

- Tăng số lượng mẫu khảo sát.
- Nghiên cứu sự phát triển, mật độ và khả năng tạo độc tố của *S. aureus* ở các thời điểm trước 16 giờ cũng như ở các thời điểm sau 72 giờ.
- Kiểm tra khả năng tạo độc tố của các chủng *S. aureus* trong thực phẩm bằng cách cho nhiễm các chủng có khả năng tạo độc tố vào thực phẩm và thử nghiệm độc tố.
- Tính lượng độc tố SE từ giá trị OD, từ đó xác định lượng độc tố đó có đủ gây ngộ độc không.
- Nghiên cứu, ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử khác trong việc chẩn đoán SE.

PHẦN 6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Nguyễn Văn Hải và Lê Trung Hải. *Nhận xét 173 trường hợp ngộ độc thực phẩm tại Khánh Hòa 2001-2004*, Trung tâm y tế dự phòng tỉnh Khánh Hòa, Thông tin khoa học, Cục an toàn vệ sinh thực phẩm, 2005.
<<http://www.vfa.gov.vn/Default.aspx>>
2. Bùi Thế Hiền, Tô Thị Thu và Cộng sự. *Tình hình ô nhiễm thực phẩm do vi sinh vật tại hai xã huyện Kiến Xương tỉnh Thái Bình năm 2001*, Trung tâm y tế dự phòng Thái Bình, Thông tin khoa học, Cục an toàn vệ sinh thực phẩm, 2005.
<<http://www.vfa.gov.vn/Default.aspx>>
3. Nguyễn Lý Hương, Nguyễn thị Phần và Bùi Thị Kim Dung. *Khảo sát tình hình ô nhiễm vi sinh vật trên một số mặt hàng thực phẩm ăn liền bán tại các chợ ở Tp.Hồ Chí Minh trong 3 năm 2002-2004*, Trung tâm y tế dự phòng Tp.Hồ Chí Minh, Thông tin khoa học, Cục an toàn vệ sinh thực phẩm, 2005.
<<http://www.vfa.gov.vn/Default.aspx>>
4. Vương Thị Việt Hoa, 2002. *Giáo trình thực tập Vi sinh thực phẩm*. Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM. 74 trang.
5. Đỗ Thị Hòa, 2006. *Phòng chống tụ cầu trùng vàng*. Khoa học phổ thông, số 30/06.
6. Cục an toàn vệ sinh thực phẩm, 2006. *Cơ sở dữ liệu ngộ độc thực phẩm*.
<<http://www.vfa.gov.vn/Default.aspx>>
7. Nguyễn Đỗ Phúc, Hoàng Hoài Phương và Bùi Kiều Nương. *Đánh giá mức độ ô nhiễm vi sinh vật thức ăn đường phố tại thành phố Hồ Chí Minh năm 2002*, Viện Vệ Sinh Y tế Công Cộng Tp HCM, Thông tin khoa học, Cục an toàn vệ sinh thực phẩm, 2003.
<<http://www.vfa.gov.vn/Default.aspx>>
8. Bộ môn vi sinh – khoa Y, 1996. *Thực tập vi sinh học và miễn dịch học*. Trường Đại học Y dược TP.HCM. 134 trang.
9. Trần Linh Thuốc, 2002. *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. Nxb Giáo dục. 230 trang.

Tài liệu tiếng nước ngoài

10. Beatriz Pinto, Empar Chenoll và Rosa Azna, 2004. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 340-350. Elsevier Science.
11. Capucine Letetre, Sylvie Perelle, Françoise Dilasser và Patrick Fach, 2003. Detectio and genotyping by real-time PCR of the Staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. *Molecular and Cellular Probes* 17: 139-147. Elsevier Science.
12. C H Collins, Patricia M Lyne và J M Grange, 1995. Staphylococcus and Micococcus. *Collines and Lyne's Microbiological Methods*, (C H Collins, Patricia M Lyne và J M Grange). Butterworth-Heinemann Ltd. p.353-359.
13. C. Letertre, S. Perelle, F. Dilasser và P. Fach, 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Microbiology* 95: 38-43. The Society for Applied Microbiology.
14. C. Vernozy-Rozand, C. Mazuy-Cruchaudet, C. Bavai và Y. Richard, 2004. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxin from food. *Letter in Applied Microbiology* 39: 1390-394. The Society for Applied Microbiology.
15. D.L.K.Ng và L.Tay, 1992. Enterotoxigenic strains of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in drinks and ready-to-eat foods. *Food Microbiology* 10: 317-320. Academic Press Limited.
16. Ernest Jawetz, Joseph L. Melnick, Edward A. Adelberg, George F. Brooks, Janet S. Butel và L. Nicholas Ornston, 1989. The Staphylococci, *Medical Microbiology* (Ernest Jawetz, Joseph L. Melnick, Edward A. Adelberg, George F. Brooks, Janet S. Butel và L. Nicholas Ornston). Prentice-Hall International Inc, USA. p.187-192.
17. G. Normanno, A. firinu, S. Virgilio, G. Mula, A. Dambrosio, A. Poggiu, L. Decastelli, R. Mioni, S. scuota, G. Bolzoni, E. Di Giannatale, A.P. Salinetti, G.La Salandra, M. bartoli, F. Zuccon, T. Pirino, S.Sias, A. Parisi, N.C. Quaglia và G.V. Celano, 2004. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 98: 73-79. Elsevier Science.
18. Hiroshi Fujikawa và Satoshi Morozumi, 2005. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology* 23: 260-267. Elsevier Science.
19. H.J.Jogensen, T. Mork, H.R.Hogasen và L.M.Rorvik, 2004. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk in Norway. *Journal of Applied Microbiology* 99: 158-166. The Society for Applied Microbiology.

20. H.-L. Wei và C.-S. Chiou, 2001. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. *Epidemiol Infect* 128: 15-20. Cambridge University Press.
21. H.Y. Tsen, G.K.Yu, K.C. Wang, S.J.Wang, M.Y. Chang và L.Y. Lin, 1996. Comparison of the enterotoxigenic types, toxic shock syndrom I (TSSS-1) strains and antibiotic susceptibility for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from food and clinical sample. *Food Microbiology* 15: 33-41. Academic Press Limited.
22. J.A. Boerema, R. Clemens và G. Bright Well, 2005. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* 107: 192-201. Elsevier Science.
23. J.M. Fueyo, M.C. Martin, M.A. Gonzalez-Hevia và M.C.Mendoza, 2000. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 67: 139-145. Elsevier Science.
24. J.P. Rosec và O. Gigaud, 2002. Staphylococci enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology* 77: 61-70. Elsevier Science.
25. Kenneth Todar. *Todar's Online Textbook of Bacteriology University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology (Staphylococcus)*. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, 2005.
<<http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>>
26. L.C. Braga, J.W. Shupp, C. Cummings, M. Jett, J.A. Takahashi, L.S. Carmo, E. Chartone-Souza và M.A.Nascimento, 2004. Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth than dsubse quententero toxin production. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 335-339. Elsevier Ireland.
27. L. Simeão do Carmo, R. Souza Dias, V. Roberto Linardi, M. Jose de Sena, D. Aparecida dos Santos, M. Eduardo de Faria, E. Castro Pena, M. Jett và L.Guilherme Heneine, 2001. Food poisoning enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology* 19: 9-14. Elsevier Science Ltd.
28. Mary K. Sandel và John L. McKillip, 2002. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* to the food industry using improvement on traditional approaches. *Food control* 15: 5-10. Elsevier Science.
29. N.F. Lightfoot và E.A. Maier, 1998. *Microbiological Analysis of Food and Water: Guideline for Quality Assurance*. Elsevier. 266 trang.

30. Nighat P.Kokan và Merline S Bergdoll,1987. Detection of Low-Enterotoxin-Producing *Staphylococcus aureus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* Nov.1987: 2675-2676. American Society for Microbiology.
31. Naomi Balaban và Avraham Rasooly, 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 61: 1-10. Elsevier Science.
32. Norinaga Miwa, Asako Kawamura, Takashi Masuda và Masato Akiyama, 2000. An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction-negative *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* 64: 361-366. Elsevier Science.
33. Paul A. Gulig và David Brumbaugh. *The Virtual Microbiology Lab (Key to Lap Images)*, University of Florida, June 2006.
<<http://www.mgm.ufl.edu/%7Egulig/mmid/mmid%2Dlab/labimage/imagky.html>>
34. P J Bremer, G C Fletcher và C Osborne. *Staphylococcus aureus*. Nee Zealand Institute for Crop and Food Research, April 2004.
<<http://www.crop.cri.nz/home/research/marine/pathogens/staphylococcus.pdf>>
35. Reginald W. Bennett và Gayle A. Lancette. *Bacteriological Analytical Manual Online (Chapter12: Staphylococcus aureus)*. Center for Food Safety & Applied Nutrition, U.S.Food and Drug Administration, January 2001.
36. Rosamund M. Baird và W.H.Lee, 1995. Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* 26: 15-24. Elsevier Science.
37. Scott E Martin, John J Iandolo, J Harvey, A Gilmour, Sita R Tatini, Reginald Bennett và Merlin S Bergdoll, 2000. *Staphylococcus*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, (Richard K.Robinson, Carl A.Batt và Pradip D.Patel). Academic Press, San Diego - San Francisco - New York - Boston - London - Sydney - Tokyo. p.2062-2083.
38. SOM 208 Microbiology Syllabus (*The Staphylococci*), UCSD School of Medicine, January 2006.
<http://www.ratsteachmicro.com/Staphylococci_Notes/HCOE_CAI_Review_Notes_Staphylococci.htm>
39. Stephen T. Abedon. *Site Index (Supplemental Lecture)*. The Ohio State University, March 1998.
<http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/biol2025.htm#stationary_phase>
40. Susana M. Portopcarrero, Melissa Newman và Benjy Mikel, 2001. *Staphylococcus aureus* survival, staphylococci enterotoxin production and shelf

stability of country-cured hams manufactured under different processing procedures. *Meat Science* 62: 267-273. Elsevier Science.

41. Viktoria atanmassova, Alexandra Meindl và Christian Ring, 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococci enterotoxin in raw pork and uncooked smoked ham – a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology* 68: 105-113. Elsevier Science.

42. William G. Gilroy. *Drug-resistant staph infections becoming an increasingly difficult health challenge*. University of Notre Dame, April 2005.
<http://lumen.nd.edu/2005_04/Drug-resistantstaph.shtml>

43. Yves Le Loir, Florence Baron and Michel Gautier, 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetic and Molecular Research* 2: 63-76. FUNPEC.

PHỤ LỤC

Phụ lục A: Số liệu thô

Phụ lục A.1. Độ đậm độ *S. aureus* trên môi trường TSGM

STT	Mã số chủng	0 giờ (cfu/ml)	16 giờ (cfu/ml)	24 giờ (cfu/ml)	48 giờ (cfu/ml)	72 giờ (cfu/ml)
1	M168	9.3×10^5	4.8×10^7	8.1×10^7	1.5×10^8	7.6×10^7
2	N88/05	8.1×10^5	7.0×10^6	1.7×10^7	2.0×10^7	9.6×10^6
3	H110	2.8×10^6	1.4×10^7	3.0×10^7	1.5×10^7	4.0×10^6
4	72/NĐ	9.6×10^5	2.1×10^8	6.0×10^8	4.7×10^8	2.3×10^8
5	H117	1.2×10^6	1.3×10^8	1.8×10^8	2.8×10^8	7.9×10^7
6	B9	3.1×10^6	1.7×10^8	3.0×10^8	6.0×10^8	2.2×10^8
7	N76/05	1.8×10^6	6.1×10^7	4.5×10^7	1.7×10^8	9.4×10^7
8	M156	3.0×10^6	7.7×10^7	8.2×10^7	1.8×10^8	6.2×10^7
9	M69	2.4×10^6	1.4×10^7	4.6×10^7	2.1×10^8	1.4×10^8
10	V30	2.0×10^6	2.9×10^8	2.8×10^8	2.0×10^8	1.1×10^8
11	G147/05	7.2×10^5	1.9×10^8	2.8×10^8	1.1×10^8	6.5×10^7
12	D2/06	1.1×10^6	5.5×10^7	6.8×10^7	5.8×10^8	3.5×10^7
13	Na1	3.2×10^6	2.9×10^8	3.4×10^8	2.8×10^8	1.8×10^8
14	V29	1.8×10^6	9.0×10^6	1.4×10^8	2.5×10^7	6.0×10^6
15	G168/05	6.0×10^4	3.0×10^6	2.6×10^7	2.5×10^7	2.3×10^7
16	M73 BVND05	8.8×10^5	1.8×10^8	3.9×10^8	2.4×10^8	1.2×10^8
17	V25	6.9×10^5	2.1×10^8	9.6×10^7	5.8×10^7	7.0×10^6
18	Na5	1.9×10^6	6.3×10^8	6.9×10^8	2.6×10^8	2.3×10^8
19	D1/06	8.2×10^5	4.2×10^7	3.6×10^7	3.4×10^7	8.5×10^6
20	B118/06	1.5×10^6	1.8×10^7	6.2×10^7	1.9×10^7	6.9×10^6
21	D6/06	3.0×10^6	2.9×10^8	1.8×10^8	1.0×10^8	5.7×10^7
22	D11/06	4.6×10^6	1.0×10^8	1.4×10^8	8.3×10^7	4.8×10^7
23	K17/ĐT	5.4×10^5	1.6×10^7	2.5×10^7	1.9×10^7	6.8×10^6
24	V13/ĐT	5.5×10^5	5.6×10^7	4.1×10^7	1.6×10^7	7.7×10^6
25	V14/ĐT	1.5×10^6	5.1×10^7	2.2×10^8	8.8×10^7	1.5×10^7
26	V15/ĐT	3.0×10^6	5.5×10^8	4.6×10^8	3.4×10^8	1.5×10^8
27	Tss/GS	5.2×10^7	6.7×10^7	5.2×10^7	4.1×10^7	1.9×10^7
28	Tpp/GS	6.9×10^7	4.2×10^7	6.6×10^7	8.4×10^7	2.9×10^7
29	Tkk/GS	5.2×10^7	5.7×10^8	6.6×10^8	1.2×10^9	1.4×10^8
30	V28/ĐT	1.3×10^6	8.0×10^7	9.4×10^7	5.4×10^7	4.0×10^7
31	V29/ĐT	2.0×10^6	5.6×10^7	2.4×10^8	1.4×10^8	8.4×10^7
32	M64 BVND05	6.0×10^5	1.9×10^7	8.0×10^6	7.0×10^6	1.8×10^6
33	V34/ĐT	2.7×10^6	2.6×10^8	3.0×10^8	7.3×10^8	2.1×10^7
34	V35/ĐT	2.6×10^6	2.5×10^8	5.3×10^8	5.7×10^8	2.7×10^8
35	V36/ĐT	4.2×10^6	1.2×10^8	3.0×10^8	8.0×10^6	2.7×10^5
36	E2/NĐ06	1.5×10^6	2.0×10^8	3.4×10^8	2.1×10^8	1.2×10^8

Phụ lục A.2. Độ đậm độ *S. aureus* trên môi trường BHI

STT	Mã số chủng	0 giờ (cfu/ml)	16 giờ (cfu/ml)	24 giờ (cfu/ml)	48 giờ (cfu/ml)	72 giờ (cfu/ml)
1	M168	8.5×10^5	3.4×10^7	4.4×10^7	6.4×10^7	5.1×10^7
2	N88/05	1.1×10^6	1.6×10^7	2.5×10^7	4.6×10^7	4.4×10^7
3	H110	3.3×10^6	1.2×10^7	1.2×10^7	7.0×10^6	1×10^6
4	72/NĐ	3.9×10^5	5.0×10^7	8.6×10^7	1.3×10^8	1.3×10^8
5	H117	7.4×10^5	1.1×10^8	9.9×10^7	5.2×10^7	4.2×10^8
6	B9	2.3×10^6	1.4×10^8	1.5×10^8	8.7×10^7	1.3×10^8
7	N76/05	1.3×10^6	3.9×10^7	8.1×10^7	4.3×10^7	6.3×10^7
8	M156	2.4×10^6	1.8×10^8	1.9×10^8	1.7×10^8	9.5×10^7
9	M69	1.4×10^6	1.7×10^8	1.6×10^8	1.4×10^8	5.0×10^7
10	V30	2.4×10^6	3.0×10^8	2.8×10^8	5.0×10^7	2.1×10^7
11	G147/05	5.8×10^5	2.3×10^8	1.8×10^8	5.3×10^7	5.0×10^7
12	D2/06	7.6×10^5	7.0×10^7	8.0×10^7	5.3×10^7	5.2×10^7
13	Na1	3.3×10^6	2.9×10^8	2.9×10^8	1.8×10^8	7.8×10^7
14	V29	1.4×10^6	1.0×10^8	9.3×10^7	1.1×10^8	6.1×10^7
15	G168/05	5.5×10^5	7.2×10^7	5.8×10^7	4.2×10^7	1.3×10^7
16	M73 BVND05	1.1×10^6	3.0×10^8	3.0×10^8	4.9×10^8	1.2×10^8
17	V25	6.7×10^5	1.7×10^7	3.9×10^7	4.0×10^7	3.6×10^7
18	Na5	1.5×10^6	2.2×10^8	6.0×10^8	8.2×10^7	1.0×10^8
19	D1/06	6.0×10^5	9.0×10^6	5.1×10^7	3.5×10^7	8.2×10^7
20	B118/06	1.2×10^6	1.6×10^8	8.1×10^8	8.2×10^7	5.5×10^7
21	D6/06	3.8×10^6	6.3×10^8	3.3×10^8	4.6×10^7	7.1×10^7
22	D11/06	5.8×10^6	3.6×10^8	7.4×10^7	4.7×10^7	7.3×10^7
23	K17/ĐT	5.6×10^5	6.1×10^7	7.6×10^7	1.1×10^8	9.2×10^7
24	V13/ĐT	7.1×10^5	4.1×10^7	4.8×10^7	2.3×10^7	1.4×10^8
25	V14/ĐT	1.5×10^6	4.9×10^8	5.0×10^8	7.2×10^7	1.2×10^8
26	V15/ĐT	2.4×10^6	4.4×10^8	5.3×10^8	6.3×10^7	1.6×10^8
27	Tss/GS	1.2×10^6	9.1×10^7	1.1×10^8	9.5×10^7	4.8×10^7
28	Tpp/GS	7.5×10^5	1.9×10^8	2.0×10^8	4.3×10^7	5.7×10^7
29	Tkk/GS	8.1×10^5	2.3×10^8	2.7×10^8	1.7×10^7	1.7×10^7
30	V28/ĐT	1.5×10^6	9.3×10^7	1.7×10^8	1.6×10^8	1.3×10^8
31	V29/ĐT	1.7×10^6	2.9×10^8	1.6×10^8	1.1×10^8	1.1×10^8
32	M64 BVND05	3.9×10^5	7.7×10^7	7.9×10^7	2.4×10^7	1.8×10^7
33	V34/ĐT	2.3×10^6	3.8×10^8	4.6×10^8	2.5×10^8	1.2×10^8
34	V35/ĐT	2.2×10^6	3.0×10^8	4.2×10^8	2.6×10^8	3.4×10^8
35	V36/ĐT	4.2×10^6	9.6×10^7	4.2×10^7	4×10^6	1.4×10^5
36	E2/NĐ06	2.4×10^6	2.9×10^8	3.8×10^8	8.7×10^7	7.3×10^7

Phụ lục B: Kết quả phân tích thống kê

Phụ lục B.1. Bảng phân tích ANOVA đậm độ *S. aureus*

Analysis of Variance for DAMDO.DAMDO - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:DAMDO.THOIGIAN	52.549630	4	13.137407	62.641	.0000
B:DAMDO.MOITRUONG	.055225	1	.055225	.263	.6146
INTERACTIONS					
AB	.7976700	4	.1994175	.951	.4386
RESIDUAL	18.875350	90	.2097261		
TOTAL (CORRECTED)	72.277875	99			

0 missing values have been excluded.

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Phụ lục B.2. Trắc nghiệm chi tiết về đậm độ - thời gian

Multiple range analysis for DAMDO.DAMDO by DAMDO.THOIGIAN

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

0	20	6.2060000	X
72	20	7.7375000	X
16	20	7.9920000	XX
48	20	8.0375000	X
24	20	8.1695000	X

contrast	difference	limits
0 - 16	-1.78600	0.28777 *
0 - 24	-1.96350	0.28777 *
0 - 48	-1.83150	0.28777 *
0 - 72	-1.53150	0.28777 *
16 - 24	-0.17750	0.28777
16 - 48	-0.04550	0.28777
16 - 72	0.25450	0.28777
24 - 48	0.13200	0.28777
24 - 72	0.43200	0.28777 *
48 - 72	0.30000	0.28777 *

* denotes a statistically significant difference.

Phụ lục B.3. Trắc nghiệm chi tiết về đậm độ - môi trường

Multiple range analysis for DAMDO.DAMDO by DAMDO.MOITRUONG

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

B	50	7.6050000	X
T	50	7.6520000	X

contrast	difference	limits
T - B	0.04700	0.18200

* denotes a statistically significant difference.

Phụ lục B.4. Bảng phân tích ANOVA độc tố *S. aureus*

Analysis of Variance for DOCTO.DOCTO - Type III Sums of Squares

Source of variation	Sum of Squares	d.f.	Mean square	F-ratio	Sig. level
MAIN EFFECTS					
A:DOCTO.THOIGIAN	8.4499463	3	2.8166488	2.943	.0387
B:DOCTO.MOITRUONG	.1124250	1	.1124250	.117	.7365
INTERACTIONS					
AB	.0429543	3	.0143181	.015	.9975
RESIDUAL	68.916709	72	.9571765		
TOTAL (CORRECTED)	77.522035	79			

0 missing values have been excluded.

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Phụ lục B.5. Trắc nghiệm chi tiết về độc tố - thời gian

Multiple range analysis for DOCTO.DOCTO by DOCTO.THOIGIAN

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

16	20	1.4508500	X
24	20	1.9073500	XX
48	20	2.1395000	X
72	20	2.3183500	X

contrast	difference	limits
16 - 24	-0.45650	0.61688
16 - 48	-0.68865	0.61688 *
16 - 72	-0.86750	0.61688 *
24 - 48	-0.23215	0.61688
24 - 72	-0.41100	0.61688
48 - 72	-0.17885	0.61688

* denotes a statistically significant difference.
 * denotes a statistically significant difference.

Phụ lục B.6. Trắc nghiệm chi tiết về độc tố - môi trường

Multiple range analysis for DOCTO.DOCTO by DOCTO.MOITRUONG

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

B	40	1.9165250	X
T	40	1.9915000	X

contrast	difference	limits
T - B	0.07498	0.43620

* denotes a statistically significant difference.

Phụ lục B.7. Tương quan giữa đậm độ và độc tố trên môi trường BHI

Correlations

		DAMDOB	DOCTOB
DAMDOB	Pearson Correlation	1	.015
	Sig. (2-tailed)	.	.928
	N	40	40
DOCTOB	Pearson Correlation	.015	1
	Sig. (2-tailed)	.928	.
	N	40	40

Phụ lục B.8. Tương quan giữa đậm độ và độc tố trên môi trường TSGM

Correlations

		DAMDOT	DOCTOT
DAMDOT	Pearson Correlation	1	.111
	Sig. (2-tailed)	.	.495
	N	40	40
DOCTOT	Pearson Correlation	.111	1
	Sig. (2-tailed)	.495	.
	N	40	40

Ghi chú: B: BHI

T: TSGM

Phụ lục C: Thành phần môi trường

C.1. Môi trường Chapman (MSA - Manitol Salt phenol-red Agar)

C.1.1. Thành phần g/l

- Peptones 10
- Meat extract 1
- Sodium chloride 75
- D (-) Manitol 10
- Phenol red 0,025
- Agar 12

C.1.2. Cách pha: Hòa 108 g/l lit nước cất, đun sôi, hấp ở 121°C/15 phút. Để đĩa, pH cuối 7,4 ±2 ở 25°C.

C.2. Môi trường BP (Baird-Paker agar)

<i>C.2.1. Thành phần</i>	<i>g/l</i>
○ Dịch trích nấm men	1
○ Ammonium dihydrogen phosphate	1
○ Potassium chloride	0,2
○ Magnium sulphate	0,2
○ Agar	12

C.2.2. Cách pha: Hòa 58g/0,95 lit nước cất, đun sôi, hấp 121°C/15 phút. pH cuối là $6,8 \pm 0,2$ ở 25°C. Thêm 5 ml huyền phù lòng đỏ trứng (ở nhiệt độ 45-50°C).

C.3. Môi trường TSGM (Tetra Staphylococcus Growth Medium)

<i>C.3.1. Thành phần</i>	
○ Hydrolysed protein	
○ Beef extract	
○ Yeast extract	
○ Manitol	
○ Muối vô cơ và hữu cơ	

C.3.2. Cách pha: Hòa tan 70g vào 1lit nước cất, đun nóng để tan hoàn toàn. Hấp 121°C/15 phút. pH cuối là $7,5 \pm 0,2$ ở 25°C.

C.4. Môi trường BHI (Brain Heart Infusion broth)

<i>C.4.1. Thành phần</i>	<i>g/l</i>
○ Nutrient substrate	27,5
○ D (+) glucose	2
○ Sodiumchloride	5
○ Di-sodium hydrogen phosphate	2,5

C.4.2. Cách pha: Hòa tan 37g/l nước cất. Hấp 121°C/15 phút. pH cuối là $7,4 \pm 0,2$ ở 25°C.

C.5. Môi trường TSB (Tryptic Soy Broth)

<i>C.5.1. Thành phần:</i>	<i>g/l</i>
○ Trypticase pepton	17g
○ Phytone peptone	3g
○ NaCl	5g
○ K ₂ HPO ₄	2,5g
○ Glucose	2,5g

C.5.2. Cách pha: Hòa tan tất cả vào 1lit nước cất. Hấp 121°C/15 phút. pH cuối là 7,4 ±0,2.

C.6. Peptone đậm

C.5.1. Thành phần: g/l

- Peptone 10
- NaCl 10

C.5.2. Cách pha: Hòa tan vào 1lit nước cất, phân phối vào ống nghiệm. Hấp 121°C/15 phút. pH cuối là 7,2.