

XÁC ĐỊNH TỶ LỆ NHIỄM VÀ TÍNH KHÁNG KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* VÀ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* KHÁNG METHICILLIN (MRSA) PHÂN LẬP TỪ SỮA BÒ TƯƠI

Hoàng Minh Đức*, Trần Thị Khánh Hoà,
Nguyễn Thế Hoàng Long, Hoàng Minh Sơn
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ email: hoangminhduc@vnua.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích xác định tỷ lệ lưu hành, tính kháng kháng sinh và đặc tính sinh học phân tử của vi khuẩn *Staphylococcus aureus* phân lập được từ 400 mẫu sữa bò tươi được thu thập trên địa bàn huyện Ba Vì, Thành phố Hà Nội. Kết quả nghiên cứu cho thấy có 21/400 (5,25%) mẫu sữa cho kết quả dương tính với vi khuẩn *S. aureus*. Các chủng *S. aureus* phân lập được trong nghiên cứu này có tỷ lệ kháng cao nhất với penicillin (95,24%), tiếp đến là ampicillin (76,19%) và cefazoline (61,9%). Ngược lại, tỷ lệ kháng thấp được ghi nhận với chloramphenicol, clindamycin, ciprofloxacin và norfloxacin (đồng tỷ lệ là 4,76%). Kết quả định danh các chủng phân lập được bằng kỹ thuật PCR đã xác nhận có 5/21 (23,81%) chủng là *S. aureus* kháng methicillin (MRSA) và toàn bộ các chủng MRSA này đều mang gen *mecA*. Đáng chú ý là 3/5 (60%) chủng MRSA mang gen *sea*, 1/5 (20%) chủng mang gen *seb* và 1/5 (20%) chủng mang gen *sed*. Không ghi nhận sự xuất hiện của gen *sec*, *see*, *mecC* và *pvl* ở tất cả các chủng MRSA phân lập được.

Từ khóa: *S. aureus*, sữa tươi, kháng kháng sinh, độc tố.

Determining infection rate and antibiotics resistance of *Staphylococcus aureus*, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteria isolated from fresh cow milk

Hoang Minh Duc, Tran Thi Khanh Hoa,
Nguyen The Hoang Long, Hoang Minh Son

SUMMARY

This study was conducted to determine the prevalence, antibiotic resistance profile, and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from 400 fresh cow milk samples collected in Ba Vi district, Ha Noi City. The studied results showed that there were 21/400 (5.25%) milk samples positive with *S. aureus*. The isolated *S. aureus* strains in this study resisted at the highest rate to penicillin (95.24%), followed by ampicillin (76.19%), and cefazoline (61.9%). On the contrary, they resisted at the low rate to chloramphenicol, clindamycin, ciprofloxacin, and norfloxacin (with the same resistance rate of 4.76%). The identification result by PCR technique revealed that 5/21 (23.81%) of the isolates were methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), and all of these MRSA strains carried *mecA* gene. Notably, 3/5 (60%) MRSA isolates harbored *sea* gene, 1/5 (20%) strains carried *seb* gene, and 1/5 (20%) strains carried *sed* gene. The *sec*, *see*, *pvl*, and *mecC* genes were not detected in all MRSA isolates.

Keywords: *S. aureus*, fresh milk, antibiotic resistance, toxins.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) là tụ cầu khuẩn gram dương thuộc họ Staphylococcaceae. Vi khuẩn này được biết đến là nguyên nhân phổ biến nhất gây ngộ độc thực phẩm nguy hiểm bậc nhất bởi khả năng sản sinh độc tố ruột bền nhiệt (SE), màng sinh học (biofilm), và khả năng kháng lại nhiều nhóm kháng sinh (Duc và cs., 2020). Đánh giá của Trung tâm Kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ (CDC) về bệnh truyền qua thực phẩm từ năm 2006 đến năm 2008 có 241.188 trường hợp ngộ độc thực phẩm do *S. aureus* gây ra ở Hoa Kỳ mỗi năm, dẫn đến 1.064 trường hợp nhập viện và 6 trường hợp tử vong (Wang và cs., 2022). Vi khuẩn *S. aureus* không chỉ gây ngộ độc thực phẩm cho con người mà chúng còn là một trong các tác nhân chính gây bệnh viêm vú trên bò. Vì vậy chúng có thể dễ dàng xâm nhiễm vào sữa tươi từ bầu vú bị viêm hoặc từ môi trường do quá trình vắt sữa, bảo quản và chế biến sữa không đảm bảo vệ sinh. Quá trình thanh trùng có thể vô hoạt vi khuẩn *S. aureus* nhưng không thể phá hủy SE (Liu và cs., 2017a). Do đó, sữa bò nhiễm *S. aureus* được coi là một trong các vector chính truyền vi khuẩn *S. aureus* từ bò sang người và tiêu thụ sữa bò không đảm bảo vệ sinh là nguyên nhân gây ra các vụ ngộ độc thực phẩm (McMillan *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2022).

Kháng sinh thường được ưu tiên lựa chọn để kiểm soát bệnh viêm vú ở bò và nhiễm trùng ở người (Gomes và Henriques, 2016). Vi khuẩn *S. aureus* được biết đến là một trong số các vi khuẩn có khả năng kháng nhiều loại kháng sinh khác nhau (Li và cs., 2017). Ngày càng có nhiều các công bố chỉ ra rằng *S. aureus* đã phát triển khả năng kháng kháng sinh và chuyển từ đơn kháng sang đa kháng (MDR), khiến cho vấn đề kháng kháng sinh ngày càng nghiêm trọng (Gomes và Henriques, 2016). Năm 2017, vi khuẩn *S. aureus* kháng methicillin (MRSA) đã được Tổ chức Y tế thế giới (WHO) xếp vào nhóm các vi khuẩn nguy hiểm bậc nhất cần phải nghiên cứu phát triển các loại kháng sinh thế hệ mới để kiểm soát

(WHO, 2017). Các chủng vi khuẩn này có chứa gen *mecA* mã hóa protein gắn penicillin 2a, giúp chúng có thể đề kháng với methicillin và tất cả các loại kháng sinh β -lactam khác (Fishovitz và cs., 2014). Việt Nam có rất ít các công bố về *S. aureus* kháng kháng sinh trong sữa tươi đặc biệt là các chủng MRSA; do đó, việc phân lập, xác định tỷ lệ nhiễm, và tính kháng kháng sinh của vi khuẩn *S. aureus* và MRSA trong sữa tươi là rất cần thiết.

II. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung

- Phân lập và xác định tỷ lệ nhiễm của vi khuẩn *S. aureus* từ mẫu sữa bò tươi thu thập trên địa bàn huyện Ba Vì, Thành phố Hà Nội.
- Xác định tính kháng kháng sinh của các chủng *S. aureus* phân lập được.
- Phát hiện một số gen độc lực của các chủng MRSA.

2.2. Vật liệu

- Dụng cụ, hóa chất, môi trường dùng để phân lập, định danh, xác định tính miễn cảm với kháng sinh của vi khuẩn *S. aureus* và phản ứng PCR.
- Trang thiết bị máy móc tại phòng thí nghiệm Bộ môn Thú y cộng đồng, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.
- Thời gian nghiên cứu: từ tháng 6/2022 đến tháng 8/2023.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Lấy mẫu

- Thu thập 400 mẫu sữa bò tươi tại 10 trang trại bò sữa trên địa bàn huyện Ba Vì, Hà Nội.
- Mẫu sữa được thu thập theo TCVN 6400:2010, được đựng trong các ống Facol vô trùng, ghi đầy đủ thông tin, được bảo quản lạnh và vận chuyển đến phòng thí nghiệm Bộ môn Thú y cộng đồng, khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam để phân lập vi khuẩn *S. aureus*.

2.3.2. Phân lập vi khuẩn *S. aureus* từ mẫu sữa bò tươi

Mẫu được chuẩn bị và phân lập theo TCVN 11039-6/2015. Tóm tắt như sau, 25 mL mẫu sữa tươi được đồng nhất với 225 mL dung dịch Buffered Pepton Water (BPW). Sau đó, mẫu được tiếp tục pha loãng thập phân. Tại mỗi nồng độ pha loãng, 1 mL mẫu được láng trên 3 đĩa (0,3-0,4 mL/đĩa) môi trường chọn lọc Baird-Parker Agar (BP) bổ sung Egg Yolk Tellurite Emulsion (EYT) và 6,5% NaCl; ủ 37°C trong vòng 24-48 h.

Khuẩn lạc điển hình của *S. aureus* trên thạch BP+EYT (tâm đen có quang sáng bao xung quanh, hình 1) sẽ được nuôi cấy trong môi trường Brain Heart Infusion Broth (BHI) ở 37°C trong 24 h, nhuộm gram (hình 2) và thử các phản ứng sinh hóa Coagulase (hình 3) để khẳng định. Các chủng *S. aureus* dương tính với Coagulase sẽ được giữ giống trong glycerol 20% ở nhiệt độ -70°C.

2.3.3. Xác định tính kháng kháng sinh của các *S. aureus* phân lập

Các chủng *S. aureus* phân lập được kiểm tra độ nhạy với kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Cụ thể như sau, canh khuẩn *S. aureus* được pha loãng với nước muối sinh lý 0,9% để đạt độ đục tương đương 0,5 McFarland (10^8 CFU/mL). Huyền dịch (100 μ L) sau đó được láng lên bề mặt môi trường Mueller Hilton Agar (MHA), để ở nhiệt độ

phòng cho đến khi thạch khô (khoảng 5-10 phút). Tiếp theo, dùng kẹp vô trùng đặt các đĩa giấy tẩm kháng sinh lên trên bề mặt MHA, và ủ 37°C/16-18h. Các kháng sinh được dùng trong nghiên cứu này bao gồm: Penicillin (10 μ g), ampicillin (10 μ g), cefazoline (30 μ g), cefoxitin (30 μ g), cefotaxime (30 μ g), meropenem (10 μ g), gentamicin (10 μ g), tobramycin (10 μ g), doxycycline (30 μ g), tetracycline (30 μ g), linezolid (30 μ g), quinupristin/dalfopristin (15 μ g), chloramphenicol (30 μ g), azithromycin (15 μ g), erythromycin (15 μ g), clindamycin (2 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), norfloxacin (10 μ g), trimethoprim/sulfamethoxazole (1,25/23,75 μ g), rifampin (5 μ g) (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK). Sau 16-18 giờ, đường kính vòng kháng khuẩn được đo để xác định mức độ mẫn cảm của vi khuẩn với kháng sinh theo hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn lâm sàng và phòng thí nghiệm (CLSI, 2020) và Ủy ban châu Âu về kiểm tra độ nhạy cảm với thuốc (EUCAST, 2017).

Vi khuẩn *S. aureus* ATCC 25923 được sử dụng làm chủng kiểm soát chất lượng trong thử nghiệm này.

2.3.4. Phát hiện một số gen độc lực của các chủng MRSA phân lập được

Nhóm gen 1 bao gồm gen *mecA*, *mecC*, *pvl*, *spa* được phát hiện bằng kỹ thuật multiplex-PCR theo hướng dẫn của Phòng thí nghiệm tham chiếu của Liên minh châu Âu (EURL-AR, 2012).

Bảng 1. Các cặp môi sử dụng để phát hiện một số gen độc lực của các chủng *S. aureus* phân lập

Tên môi	Trình tự nucleotide (5'-3')	Sản phẩm (bp)
spa-1113F	TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC	200-600
spa-1514R	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCT	
mecA P4	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	
mecA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG	162
pvl-F	GCTGGACAAAACCTTCTTGGAATAT	85
pvl-R	GATAGGACACCAATAAATTCTGGATTG	
mecC-F	GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC	138
mecC-R	GAAGATCTTTTCCGTTTTTCAGC	

Trong khi đó, nhóm gen 2 mã hoá độc tố đường ruột SE (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*) được phát hiện bằng kỹ thuật multiplex PCR theo phương pháp đã được mô tả bởi Savariraj và cs. (2019).

Thông tin các cặp mồi dùng cho phản ứng PCR phát hiện nhóm gen 1 và nhóm gen 2 lần lượt được thể hiện ở bảng 1 và bảng 2.

Bảng 2. Các cặp mồi sử dụng để phát hiện một số gen mã hoá độc tố đường ruột SE

Tên mồi	Trình tự nucleotide (5'-3')	Sản phẩm (bp)
SEA-F	GCAGGGAACAGCTTTAGGC	520
SEA-R	GTTCTGTAGAAGTATGAAACACG	
SEB-F	ACATGTAATTTTGATATTCGCACTG	667
SEB-R	TGCAGGCATCATGTCATACCA	
SEC-F	CTTGTATGTATGGAGGAATAACAA	248
SEC-R	TGCAGGCATCATATCATACCA	
SED-F	GTGGTGAAATAGATAGGACTGC	171
SED-R	ATATGAAGGTGCTCTGTGG	
SEE-F	TACCAATTAAC TTGTGGATAGAC	385
SEE-R	CTCTTGCACCTTACCGC	

2.3.5. Xử lý số liệu

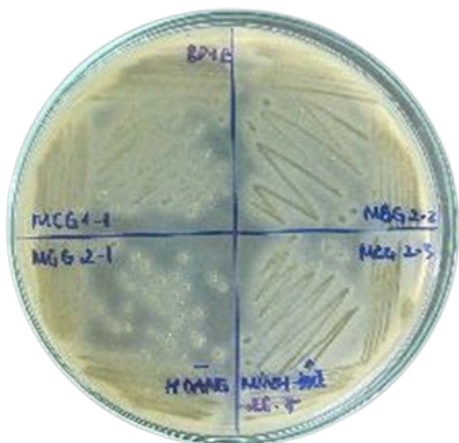
Số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm Excel 2021.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

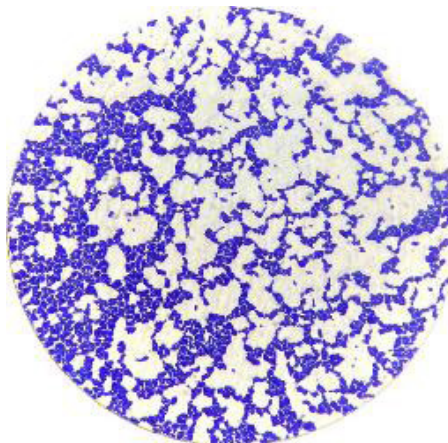
3.1. Tỷ lệ nhiễm của vi khuẩn *S. aureus* trong sữa tươi

Trong tổng số 400 mẫu sữa được kiểm tra, có 21 (5,25%) mẫu dương tính với vi khuẩn *S. aureus*. Tỷ lệ các mẫu sữa nhiễm *S. aureus* trong

ngiên cứu của chúng tôi khá tương đồng với báo cáo của Trịnh Đình Thâu và cs. (2017) khi công bố tỷ lệ nhiễm *S. aureus* trong mẫu sữa tươi được thu thập từ các cửa hàng và trạm thu gom sữa trên địa bàn huyện Ba Vì, thành phố Hà Nội là 6,67%. Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu sữa nhiễm *S. aureus* trong nghiên cứu này thấp hơn tỷ lệ (13,75%) thu được trong nghiên cứu thực hiện bởi Cam Thị Thu Hà và cs. (2019) về chất lượng sữa bò tươi tại xã Phù Đồng, huyện Gia Lâm, thành phố Hà Nội.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc *S. aureus* trên môi trường thạch Baird-Parker bổ sung lòng đỏ trứng gà



Hình 2. Hình thái vi khuẩn *S. aureus* dưới kính hiển vi (x1000)

Tương tự, tỷ lệ nhiễm trong nghiên cứu của chúng tôi cũng thấp hơn so với tỷ lệ nhiễm của một số nghiên cứu trên thế giới. Ví dụ, tỷ lệ dương tính với *S. aureus* từ các mẫu sữa tươi tại Iran là 12,4% (Jamali và cs., 2015). Nghiên cứu được thực hiện tại Ấn Độ cho thấy tỷ lệ hiện diện vi khuẩn *S. aureus* trong các mẫu sữa tươi là 19,84% (Sharma và cs., 2017). Tương tự, kết

quả nghiên cứu tại Ý chỉ ra rằng 12,9% số mẫu sữa kiểm tra nhiễm vi khuẩn *S. aureus* (Basanisi và cs., 2017). Một nghiên cứu khác tại Ethiopia cho thấy tỷ lệ mẫu sữa nhiễm vi khuẩn *S. aureus* là 15,3% (Regasa và cs., 2019). Những sự khác biệt này có thể do sự khác biệt vùng miền, thời điểm, phương pháp và số lượng mẫu được khảo sát trong các nghiên cứu.



Hình 3. Kết quả thử phản ứng sinh hóa Coagulase
Đối chứng âm (A), Đối chứng dương (B), Chứng kiểm tra (C)

3.2. Tính kháng kháng sinh của vi khuẩn *S. aureus* phân lập

Bảng 3. Tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng *S. aureus* phân lập (n=21)

STT	Nhóm kháng sinh	Loại kháng sinh	Số chủng kháng	Tỷ lệ kháng (%)
1	Penicillins	Penicillin	20	95,24
2		Ampicillin	16	76,19
3		Cefazoline	13	61,9
4	Cephalosporins	Cefoxitin	5	23,81
5		Cefotaxime	6	28,57
6	Carbapenems	Meropenem	0	0
7	Amino-glycoside	Gentamycin	6	28,57
8		Tobramycin	4	19,05
9	Tetracyclines	Doxycycline	4	19,05
10		Tetracycline	4	19,05
11	Oxazolidonones	Linezolid	0	0
12	Streptogramins	Quinupristin-dalfopristin	0	0
13	Phenicol	Chloramphenicol	1	4,76
14	Macrolides	Azithromycin	5	23,81
15		Erythromycin	5	23,81
16	Lincosamides	Clindamycine	1	4,76
17	Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	1	4,76
18		Norfloxacin	1	4,76
19	Sulfonamides	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	6	28,57
20	Rifampin	Rifampin	0	0

Kết quả kiểm tra tính mẫn cảm với 20 loại kháng sinh của 21 chủng *S. aureus* phân lập được trình bày trong bảng 3. Tỷ lệ kháng cao nhất được ghi nhận với các kháng sinh thuộc nhóm β -lactams bao gồm penicillin (95,24%), ampicillin (76,19%) và cefazoline (61,9%). Các chủng *S. aureus* kháng penicillin xuất hiện ngay sau khi loại kháng sinh này được sử dụng vào đầu những năm 1940 (Lowy, 2003). Chúng sản sinh ra enzyme β -lactamase thủy phân các liên kết β -lactam quan trọng và phá hủy hoạt tính kháng khuẩn của kháng sinh. Việc thay thế chuỗi aminoadipoyl tự nhiên của penicillin bằng các phân tử lớn hơn đã tạo ra các biến thể bán tổng hợp kháng lại với β -lactamase. Methicillin là kháng sinh bán tổng hợp đầu tiên thuộc nhóm này. Tuy nhiên chúng có nhược điểm là không bền với acid (Foster, 2017).

Trái lại, các chủng *S. aureus* phân lập được trong nghiên cứu này có tỷ lệ kháng thấp nhất với các kháng sinh chloramphenicol, clindamycine, ciprofloxacin và norfloxacin với cùng tỷ lệ là 4,76%. Đáng chú ý, không phát hiện bất kỳ chủng phân lập nào kháng đối với các kháng sinh meropenem, linezolid, quinupristin-dalfopristin và rifampin.

Tỷ lệ kháng cao của *S. aureus* với các kháng sinh penicillin, ampicillin trong nghiên cứu của chúng tôi là tương đồng với một số nghiên cứu trên thế giới (bảng 3). Cụ thể, nghiên cứu tại Ai Cập cho thấy tỷ lệ kháng với penicillin, tetracycline, chloramphenicol, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole của các chủng *S. aureus* lần lượt là 87,9%; 65,2%; 30,9%; 27,5% và 14% (Al-Ashmawy và cs., 2016). Tương tự theo Mesquita và cs. (2019), các chủng *S. aureus* phân lập tại Brazil kháng mạnh nhất với penicillin (69%), tiếp theo là ampicillin (60%), cefotaxime (35%), gentamicin (21%), ciprofloxacin (9%), chloramphenicol (5%) và trimethoprim/sulfamethoxazole (2%). Báo cáo Zhao và cs. (2021) cho biết tỷ lệ kháng cao nhất của *S. aureus* phân lập tại Trung Quốc được ghi nhận với kháng sinh penicillin (74,4%), kể đến là erythromycin (58,7%), clindamycin (38,8%), gentamicin (8,3%), linezolid (5,8%) và trimethoprim/sulfamethoxazole (1,7%). Khả năng kháng kháng sinh cefoxitin là thường được

dùng để xác định các chủng MRSA giả định. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ kháng cefoxitin của các chủng *S. aureus* phân lập được là 23,81% thấp hơn so với các kháng sinh khác thuộc nhóm β -lactams bao gồm penicillin (95,24%), ampicillin (76,19%), cefazoline (61,9%), cefotaxime (28,57%). Tuy nhiên kết quả này lại cao hơn nghiên cứu của Tyasningsih và cs. (2022) tại Indonesia với tỷ lệ kháng cefoxitin là 15,9%.



Hình 4. Kết quả thử kháng sinh của các chủng *S. aureus* phân lập

Trong nghiên cứu này, các chủng *S. aureus* phân lập có khả năng kháng ít nhất 1 kháng sinh; chiếm tỷ lệ 95,24% (bảng 4).

Bảng 4. Tỷ lệ kháng của các chủng *S. aureus* phân lập theo số kháng sinh (n=21)

Số kháng sinh kháng	Số chủng	Tỷ lệ (%)
0	1	4,76
1	2	9,52
2	3	14,29
3	3	14,29
4	3	14,29
5	3	14,29
6	0	0
7	2	9,52
8	1	4,76
9	1	4,76
10	0	0
11	1	4,76
12	1	4,76

Trong đó 38,1% các chủng phân lập kháng 1-3 kháng sinh; 38,1% kháng 4-7 kháng sinh và 19,05% kháng 8-12 kháng sinh.

Kết quả kiểm tra tính mẫn cảm với kháng sinh cũng cho thấy 6/21 (28,57%) chủng *S. aureus* phân lập là các chủng đa kháng. Tổng cộng 16 kiểu hình kháng đã được phát hiện (bảng 5) và tất cả các kiểu hình kháng này đều có mặt penicillin. Điều này có thể do penicillin là kháng sinh đã được sử dụng từ lâu và rộng rãi trong chăn nuôi, đặc biệt trong

điều trị nhiễm khuẩn gram dương. Tỷ lệ đa kháng ghi nhận trong nghiên cứu này (28,57%) thấp hơn so với nghiên cứu tại Trung Quốc (55,4%) và Ethiopia (62,1%), nhưng cao hơn so với nghiên cứu tại Ai Cập (8%) và Nhật Bản (0,74%) (Zhao và cs., 2021; Thongratsakul và cs., 2020; Deddefo và cs., 2022; Eid và cs., 2022). Điều đó cho thấy tốc độ phát triển kháng kháng sinh ở các vùng địa lý khác nhau là khác nhau. Nguyên nhân có thể do hệ thống quản lý sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi ở các nước có sự khác biệt.

Bảng 5. Kiểu hình kháng kháng sinh của các chủng *S. aureus* phân lập

Số kháng sinh kháng	Kiểu hình kháng	Số chủng kháng
1	-Pen	2
2	-Pen-Amp	2
2	-Pen-Sxt	1
3	-Pen-Amp-Cfz	2
3	-Pen-Amp-Fox	1
4	-Pen-Amp-Cfz-Ctx	2
4	-Pen-Amp-Cfz-Sxt	1
5	-Pen-Amp-Cfz-Fox-Ctx	1
5	-Pen-Amp-Cfz-Dox-Tet	1
5	-Pen-Amp-Cfz-Gen-Tob	1
7	-Pen-Amp-Cfz-Gen-Azi-Ery-Sxt	1
7	-Pen-Azi-Ery-Cli-Cip-Nor-Sxt	1
8	-Pen-Amp-Cfz-Gen-Chl-Azi-Ery-Sxt	1
9	-Pen-Amp-Cfz-Fox-Ctx-Gen-Tob-Dox-Tet	1
11	-Pen-Amp-Cfz-Fox-Ctx-Gen-Tob-Dox-Tet-Azi-Ery	1
12	-Pen-Amp-Cfz-Fox-Ctx-Gen-Tob-Dox-Tet-Azi-Ery-Sxt	1

3.3. Phát hiện một số gen độc lực của các chủng MRSA

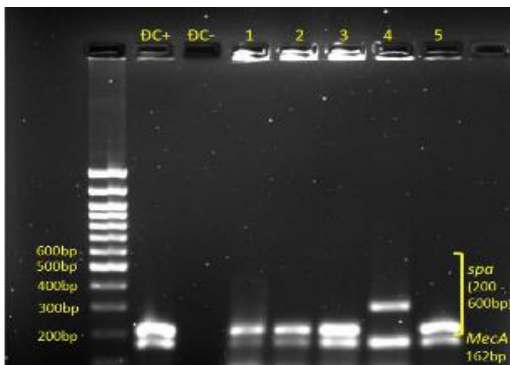
Trong nghiên cứu này, 5 chủng *S. aureus* kháng cefoxitin được coi là các chủng MRSA giả định (có kiểu hình MRSA). Các chủng MRSA giả định này được giám định thông qua việc phát hiện gen *mecA* và *mecC* theo hướng dẫn của Phòng thí nghiệm tham chiếu của Liên minh châu Âu (EURL-AR, 2012) bằng kỹ thuật multiplex-PCR. Bên cạnh đó, một số gen độc lực khác bao gồm *spa*, *pvl*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* và *see* cũng được kiểm tra. Kết quả cho

thấy 100% (5/5) các chủng MRSA đem kiểm tra có chứa gen *spa* và *mecA*, 60% mang gen *sea*, 20% mang gen *seb*, 20% mang gen *sed*, không phát hiện các chủng mang gen *sec*, *see*, *mecC* và *pvl*.

Protein A là yếu tố độc lực quan trọng giúp *S. aureus* thoát khỏi hệ miễn dịch của vật chủ. Protein A đã được mã hóa bởi gen *spa*. Ở gen *spa*, phần lặp lại nằm ở cuối đầu 3' và được xác định là vùng X; phần lặp đi lặp lại của vùng X bao gồm tối đa 12 đơn vị, mỗi đơn vị có chiều dài 24 nucleotide. Vùng 24 nucleotide này có tính đa hình cao về số

lượng và trình tự lặp lại. Sự đa dạng của vùng X tạo ra sự đa dạng của protein A. Hầu hết các chủng *S. aureus* đều mang protein A. Vì vậy gen *spa* mã hoá protein A thường được sử dụng để định danh, xác định kiểu hình, kiểu gen và đặc điểm dịch tễ học của các chủng *S. aureus* (Larsen và cs., 2008). Trong nghiên cứu này, cả 5 chủng MRSA giả định đều mang gen *spa*. Trong đó, 4/5 chủng phát hiện gen *spa* có kích thước 200 bp và 1/5 chủng mang gen *spa* có kích thước 300 bp.

Phát hiện gen *mecA* được coi là tiêu chuẩn tham chiếu để phát hiện MRSA. Gần đây sự xuất hiện của một gen tương đồng với gen *mecA* đã được báo cáo và đặt tên là *mecC*. Nhìn chung, các công bố trước đây cho thấy tần xuất hiện của gen *mecA* là cao hơn rất nhiều so với gen *mecC* (Paterson và cs., 2014). Nghiên cứu của chúng tôi thu được kết quả tương tự khi 5/5 (100%) chủng MRSA phân lập được đều mang gen *mecA* và không phát hiện thấy gen *mecC* (hình 5).



Hình 5. Kết quả PCR phát hiện một số gen độc lực của các chủng MRSA phân lập

Giếng 1: Ladder, giếng 2: Đối chứng dương, giếng 3: Đối chứng âm, giếng 4-8: Các chủng MRSA phân lập.

Độc tố ruột của *Staphylococcus* được coi là nguyên nhân chính gây ra ngộ độc thực phẩm. Các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng hơn 90% các vụ ngộ độc thực phẩm liên quan đến *S. aureus* là do độc tố SE cổ điển (Tarekne và cs., 2016). Trong đó, độc tố SEA và SED đóng vai trò chủ đạo. Trong nghiên cứu này, 3/5 (60%) số chủng MRSA phân lập dương tính với gen *sea*, 1/5 (20%) với *seb*, và 1/5 (20%) với *sed* (bảng 6). Không phát hiện

chủng MRSA mang gen *sec* và *see*. Bên cạnh độc tố SE, độc tố Paton-Valentino Leucocidin (PVL) cũng thu hút được nhiều sự chú ý. Độc tố này có thể tiêu diệt bạch cầu của vật chủ và dẫn đến hoại tử mô (W. Wang và cs., 2018). Độc tố PVL thường được báo cáo có liên quan đến MRSA khởi phát trong cộng đồng trên toàn thế giới, tuy nhiên vẫn phát hiện một số chủng MRSA cộng đồng không mang gen *pvl* (Shallcross và cs., 2013). Kết quả phát hiện gen độc lực của các chủng MRSA phân lập được trong nghiên cứu này cũng cho thấy 5/5 (100%) các chủng MRSA âm tính với gen mã hoá độc tố PVL.

Kết quả giám định các chủng MRSA thông qua việc phát hiện các gen *spa* và *mecA* chỉ ra rằng 5/21 (23,8%) chủng *S. aureus* phân lập là MRSA, tương ứng với 5/400 (1,25%) mẫu sữa dương tính với MRSA. Sự hiện diện của MRSA trong sữa và các sản phẩm sữa đã được báo cáo thường xuyên trên toàn thế giới trong hai thập kỷ qua. Nhìn chung, có sự khác biệt rõ ràng về tỷ lệ nhiễm MRSA trong sữa và các sản phẩm sữa, tùy theo loại sản phẩm và quốc gia. Tỷ lệ nhiễm cao nhất được ghi nhận ở Ả Rập Saudi (Alghizzi và Shami, 2021) và Ai Cập (Zayda và cs., 2020) với tỷ lệ lần lượt là 72,8% và 60%. Ngược lại, tỷ lệ thấp nhất được tìm thấy tại Anh (0,29%) (Cuny và cs., 2011) và Ý (0,57%) (Carfora và cs., 2016). Dễ nhận thấy là tỷ lệ phân lập MRSA trong sữa và các sản phẩm sữa là khác nhau giữa các nghiên cứu được thực hiện ở các khu vực khác nhau, giữa các quốc gia khác nhau hoặc thậm chí các khu vực trong cùng một quốc gia, điều này có thể phản ánh tính không đồng nhất của các phương pháp được sử dụng, độ nhạy của các phương pháp sàng lọc MRSA và cỡ mẫu (Al-Ashmawy và cs., 2016).

Bảng 6. Tỷ lệ phân bố của các gen mã hoá độc tố SE của các chủng MRSA phân lập

Tên gen	MRSA (n=5)	
	Số chủng dương	Tỷ lệ (%)
<i>sea</i>	3	60
<i>seb</i>	1	20
<i>sed</i>	1	20

IV. KẾT LUẬN

S. aureus kháng kháng sinh, đặc biệt là các chủng MRSA đang là mối đe dọa nghiêm trọng đến sức khỏe cộng đồng. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy tỷ lệ nhiễm của *S. aureus* và MRSA trong sữa tươi lần lượt là 5,25% (21/400) và 1,25% (5/400). Các chủng *S. aureus* phân lập được trong nghiên cứu này có tỷ lệ kháng cao với kháng sinh penicillin (95,24%), ampicillin (76,19%) và cefazoline (61,9%). Đáng chú ý có tới 19,05% (4/21) các chủng phân lập có thể kháng từ 8 đến 12 kháng sinh. Tất cả các chủng MRSA phân lập đều mang gen *spa* (5/5) và *mecA* (5/5). Ngược lại, không phát hiện gen *mecC* và *pvl* trên tất cả các chủng MRSA phân lập. Kết quả phát hiện gen mã hoá độc tố ruột cũng chỉ ra rằng 3/5 (60%) các chủng MRSA mang gen *sea*, 1/5 (20%) mang gen *seb*, và 1/5 (20%) mang gen *sed*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Al-Ashmawy, M. A., Sallam, K. I., Abd-Elghany, S. M., Elhadidy, M., & Tamura, T., 2016a. Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant staphylococcus aureus isolated from milk and dairy products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(3), 156–162. <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2038>
2. Al-Ashmawy, M. A., Sallam, K. I., Abd-Elghany, S. M., Elhadidy, M., & Tamura, T., 2016b. Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant staphylococcus aureus isolated from milk and dairy products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(3), 156–162. <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2038>
3. Alghizzi, M., & Shami, A., 2021. The prevalence of Staphylococcus aureus and methicillin resistant Staphylococcus aureus in milk and dairy products in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.004>
4. Basanisi, M. G., La Bella, G., Nobili, G., Franconieri, I., & La Salandra, G., 2017. Genotyping of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. *Food Microbiology*, 62, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.020>
5. Cam Thị Thu Hà, Phạm Hồng Ngân, Trương Lan Oanh, & Nguyễn Thị Trang, 2019. Khảo sát chất lượng sữa bò tươi tại xã phù đồng, huyện Gia Lâm, Thành phố Hà Nội. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, tập XXVI, số 3, 47-53.
6. Carfora, V., Giacinti, G., Sagrafoli, D., Marri, N., Giangolini, G., Alba, P., Feltrin, F., Sorbara, L., Amoroso, R., Caprioli, A., Amatiste, S., & Battisti, A., 2016. Methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in dairy sheep and in-contact humans: An intra-farm study. *Journal of Dairy Science*, 99(6). <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10912>
7. CLSI, 2020. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*.
8. Cuny, C., Layer, F., Strommenger, B., & Witte, W., 2011. Rare occurrence of methicillin-resistant staphylococcus aureus CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024360>
9. Duc, H. M., Son, H. M., Ngan, P. H., Sato, J., Masuda, Y., Honjoh, K. ichi, & Miyamoto, T., 2020. Isolation and application of bacteriophages alone or in combination with nisin against planktonic and biofilm cells of Staphylococcus aureus. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10581-4>
10. EUCAST, 2017. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1*.
11. EURL-AR, 2012. Protocol for PCR amplification of *mecA*, *mecC* (*mecAlga251*), *spa* and *pvl*. *September*, 1–5.

12. Fishovitz, J., Hermoso, J. A., Chang, M., & Mobashery, S., 2014. Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In *IUBMB Life* (Vol. 66, Issue 8). <https://doi.org/10.1002/iub.1289>
13. Foster, T. J., 2017. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 41, Issue 3). <https://doi.org/10.1093/femsre/fux007>
14. Gomes, F., & Henriques, M., 2016. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. In *Current Microbiology* (Vol. 72, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>
15. Jamali, H., Paydar, M., Radmehr, B., Ismail, S., & Dadrasnia, A., 2015. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. *Food Control*, 54, 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.013>
16. Larsen, A. R., Stegger, M., & Sørum, M., 2008. spa typing directly from a mecA, spa and pvl multiplex PCR assay-a cost-effective improvement for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* surveillance. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01995.x>
17. Li, T., Lu, H., Wang, X., Gao, Q., Dai, Y., Shang, J., & Li, M., 2017. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis between 2014 and 2015. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(APR). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00127>
18. Liu, H., Li, S., Meng, L., Dong, L., Zhao, S., Lan, X., Wang, J., & Zheng, N., 2017. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in northern China. *Journal of Dairy Science*, 100(11), 8796–8803. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13370>
19. Lowy, F. D., 2003. Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 111, Issue 9). <https://doi.org/10.1172/JCI18535>
20. McMillan, K., Moore, S. C., McAuley, C. M., Fegan, N., & Fox, E. M., 2016. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia. *BMC Microbiology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0789-1>
21. Mesquita, A. A., Rocha, C. M. B. M., Bruhn, F. R. P., Custódio, D. A. C., Braz, M. S., Pinto, S. M., Silva, D. B., & Costa, G. M., 2019. *Staphylococcus aureus* and streptococcus agalactiae: Prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of dairy cattle herds in minas gerais state, Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 39(5), 308–316. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5821>
22. Oliveira, R., Pinho, E., Almeida, G., Azevedo, N. F., & Almeida, C., 2022. Prevalence and Diversity of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins in Raw Milk From Northern Portugal. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.846653>
23. Paterson, G. K., Harrison, E. M., & Holmes, M. A., 2014. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In *Trends in Microbiology* (Vol. 22, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.003>
24. Regasa, S., Mengistu, S., & Abraha, A., 2019. Milk Safety Assessment, Isolation, and Antimicrobial Susceptibility Profile of *Staphylococcus aureus* in Selected Dairy Farms of Mukaturi and Sululta Town, Oromia Region, Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3063185>
25. Savariraj, W. R., Ravindran, N. B., Kannan, P., Paramasivam, R., Senthilkumar, T. M. A., Kumarasamy, P., & Rao, V. A., 2019. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from pork meat in retail outlets in

- India. *Journal of Food Safety*, 39(1). <https://doi.org/10.1111/jfs.12589>
26. Shallcross, L. J., Fragaszy, E., Johnson, A. M., & Hayward, A. C., 2013. The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(1). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70238-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70238-4)
27. Sharma, V., Sharma, S., Dahiya, D. K., Khan, A., Mathur, M., & Sharma, A., 2017. Coagulase gene polymorphism, enterotoxigenicity, biofilm production, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in North West India. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0242-9>
28. Tarekgne, E. K., Skjerdal, T., Skeie, S., Rudi, K., Porcellato, D., Félix, B., & Narvhus, J. A., 2016. Enterotoxin gene profile and molecular characterization of *staphylococcus aureus* isolates from bovine bulk milk and milk products of Tigray Region, Northern Ethiopia. *Journal of Food Protection*, 79(8). <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-003>
29. Thongratsakul, S., Usui, M., Higuchi, H., Takahashi, T., Sato, T., Poolkhet, C., & Tamura, Y., 2020. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated in raw milk from cows in Hokkaido, Japan. *Tropical Animal Health and Production*, 52(4), 1631–1637. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02169-6>
30. Trịnh Đình Thâu, & Nguyễn Thị Nhiên, 2017. Đánh giá chất lượng và mức độ nhiễm khuẩn trong sữa bò tươi trên địa bàn huyện Ba Vì, Tp Hà Nội. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y, tập XXIV, số 1*.
31. Tyasningsih, W., Ramandinianto, S. C., Ansharieta, R., Witaningrum, A. M., Permatasari, D. A., Wardhana, D. K., Effendi, M. H., & Ugbo, E. N., 2022. Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from raw milk in East Java, Indonesia. *Veterinary World*, 15(8), 2021–2028. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2021-2028>
32. Wang, H., Shen, J., Zhu, C., Ma, K., Fang, M., Li, B., Wang, W., & Xue, T., 2022. Antibiotics Resistance and Virulence of *Staphylococcus aureus* Isolates Isolated from Raw Milk from Handmade Dairy Retail Stores in Hefei City, China. *Foods*, 11(15). <https://doi.org/10.3390/foods11152185>
33. Wang, W., Lin, X., Jiang, T., Peng, Z., Xu, J., Yi, L., Li, F., Fanning, S., & Baloch, Z., 2018. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01123>
34. WHO, 2017. *WHO priority pathogens list for R&D of new antibiotics*. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
35. Zayda, M. G., Masuda, Y., Hammad, A. M., Honjoh, K. ichi, Elbagory, A. M., & Miyamoto, T., 2020. Molecular characterisation of methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-susceptible (MSSA) *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis and Egyptian raw milk cheese. *International Dairy Journal*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104646>
36. Zhao, X., Yuan, X., Hu, M., Zhang, Y., Li, L., Zhang, Q., Yuan, X., Wang, W., & Liu, Y., 2021. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk in Shandong dairy farms. *Food Control*, 125. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107836>

Ngày nhận: 2-2-2024

Ngày phản biện: 5-2-2024

Ngày đăng: 1-5-2024