

# NGHIÊN CỨU ĐỊNH DANH *Staphylococcus epidermidis* VÀ *Staphylococcus saprophyticus* TRÊN DA NGƯỜI KHỎE MẠNH BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH VẬT HỌC VÀ KỸ THUẬT PCR

Võ Đại Học<sup>2</sup>, Dương Thị Ngọc Mai<sup>2</sup>, Trần Đình Bình<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế

<sup>2</sup>Học viên lớp Cao học Y sinh học 2022-2024, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế

## TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp mô tả cắt ngang qua nuôi cấy phân lập và định danh các chủng vi khuẩn *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* trên da người khỏe mạnh bằng phương pháp truyền thống và kỹ thuật PCR đa môi tại Khoa Vi sinh, Bệnh viện Đại học Y-Dược Huế, so sánh giá trị của 2 kỹ thuật. Đã định danh 128 chủng *S. epidermidis* và 74 chủng *S. saprophyticus* dựa vào các đặc điểm sinh vật học. Kết quả định danh bằng PCR thì xác định được *S. epidermidis* 52/128 chủng chiếm 40,6% và *S. saprophyticus* là 18/74 chủng chiếm tỷ lệ 24,3%. Phương pháp PCR cho kết quả nhanh chóng, đáng tin cậy để phát hiện *S. epidermidis* và *S. saprophyticus*. Tuy nhiên, định danh hiện *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bằng các tính chất sinh vật hoá học không đòi hỏi yêu cầu cao về trang thiết bị, không yêu cầu khắt khe về mặt kỹ thuật, có thể cho kết quả khá nhanh (có thể từ 36-48 giờ), cũng có thể đáp ứng nhu cầu chẩn đoán vi sinh vật ở ngay tuyến huyện. Định danh *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bằng các tính chất sinh vật hoá học cho kết quả đại thể nhóm vi khuẩn, còn phương pháp PCR định danh đặc hiệu chủng vi khuẩn *S. epidermidis* và *S. saprophyticus*.

Từ khóa: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, PCR, phân lập và định danh.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Các tác nhân của tụ cầu coagulase âm tính (CoNS) là mầm bệnh của nhiều bệnh nhiễm trùng khác nhau hiện nay có thể là kết quả của việc sử dụng ngày càng nhiều các thủ tục xâm lấn như ống thông nội mạch trong can thiệp mạch, ghép cơ quan... đặc biệt là trên nhóm những bệnh nhân đang điều trị tích cực, bệnh nhân suy giảm miễn dịch, trẻ sinh non, bệnh nhân mắc bệnh ung bướu và bệnh nhân cấy ghép (Cunha *et al.*, 2004). Một ví dụ về những tác nhân này trong nghiên cứu 98 bệnh nhân được điều trị thở máy trên 48 giờ tại khu hậu phẫu A - Bệnh viện Trung ương Huế từ tháng 3/2010 đến tháng 3/2011 trong đó CoNS có 2 bệnh nhân chiếm 2,04% (Nguyễn Viết Quang, 2013).

Trên thế giới, các nghiên cứu về tụ cầu coagulase âm tính cũng tìm cách chẩn đoán vi sinh vật chính xác, nhanh để đánh giá sự phân bố và khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn này trong các mẫu máu và mẫu nước tiểu từ các bệnh nhân đang điều trị tại các bệnh viện. Tụ cầu coagulase âm tính được xếp thành 5 nhóm, trong đó có 2 nhóm lớn là *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bao gồm nhiều vi khuẩn khác nhau về một số tính chất sinh vật học. Tụ cầu khuẩn coagulase âm tính là những vi khuẩn phổ biến được phân lập từ mũi và nách, đầu, chân và tay. *Staphylococcus aureus* và *S. epidermidis* là những loài staphylococci phổ biến (Becker *et al.*, 2014).

Tuy nhiên, việc xác định chính xác các loài CoNS là một thách thức, do chúng có tính đa dạng và giống nhau về hình thái và cấu trúc (Lê Văn Phụng, 2009). Cho đến nay, việc định danh các CoNS có thể được thực hiện với nhiều kỹ thuật như: định danh bằng các thử nghiệm sinh vật hóa học; định danh bằng hệ thống tự động Vitek2, định danh với thang API (De Paulis Adriana *et al.*, 2003); định danh bằng hệ thống định danh khối phổ MALDI-TOF MS (Rupp, Fey, 2015); định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử gồm PCR, realtime PCR và giải trình tự gen 16S rRNA... (Shintaro *et al.*, 2011). Tuy nhiên, các nghiên cứu về định danh sinh vật học và sinh học phân tử một số loài vi khuẩn tụ cầu coagulase âm tính gây nhiễm khuẩn bệnh viện trên da người khỏe mạnh tại Việt Nam chưa có nhiều (Lê Văn Phụng, 2009). Việc định danh các loài tụ cầu dựa vào tính chất sinh vật học thường có các tính chất trùng lặp giữa các loài tụ cầu, định danh bằng phương pháp sinh vật học mất nhiều thời gian, sai số lớn. Chúng tôi tiến hành đề tài: "Nghiên cứu định danh *Staphylococcus epidermidis* và *Staphylococcus saprophyticus* trên da người khỏe mạnh bằng phương pháp sinh vật học và kỹ thuật PCR" với mục tiêu phân lập và định danh *Staphylococcus epidermidis* và *Staphylococcus saprophyticus* dựa vào các đặc điểm sinh vật học và kỹ thuật PCR để so sánh giá trị của 2 kỹ thuật trong việc chẩn đoán 2 loài vi khuẩn này.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Đối tượng

Các chủng vi khuẩn *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* được phân lập trên da người khỏe mạnh tại Bộ môn Vi Sinh, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế trong thời gian từ tháng 4/2023 đến tháng 4/2024.

### Phương pháp

#### Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp mô tả cắt ngang qua các xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn thường quy bằng phương pháp truyền thống và kỹ thuật PCR đa mồi tại bộ môn Vi Sinh, trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế.

#### Các nội dung nghiên cứu

- Thu thập các chủng vi khuẩn CoNS đã được phân lập trên da người bằng phương pháp thường quy tại Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế.

- Định danh bằng các tính chất sinh vật học bằng phương pháp truyền thống là nhuộm Gram, thử nghiệm lên men mannitol, thử nghiệm catalase dương tính, thử nghiệm coagulase trên phiến kính và trong ống nghiệm đều âm tính và kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch với đĩa kháng sinh novobiocin được thực hiện tại phòng thí nghiệm ở Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y-Dược, Đại học Huế.

- Định danh bằng kỹ thuật PCR đa mồi trên các chủng vi khuẩn đã được định danh là *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bằng phương pháp truyền thống.

- Thu thập, thống kê và phân tích các số liệu đã phân lập, xác định tỷ lệ dương tính *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* cả hai kỹ thuật và so sánh giữa hai phương pháp định danh sinh vật hóa học và PCR đa mồi.

#### Định danh *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bằng kỹ thuật PCR đa mồi.

Các cặp mồi dùng trong nghiên cứu: Sử dụng các cặp mồi theo nghiên cứu của Shintaro và đồng tác giả (2011).

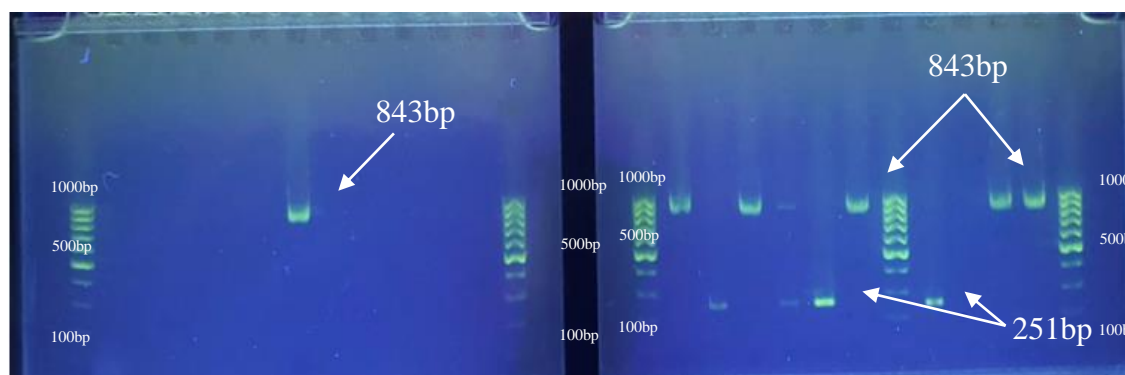
**Bảng 1. Mồi PCR được sử dụng trong nghiên cứu này**

TT	Vi khuẩn	Gen đích	Mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước (bp)	T°C
1.	<i>S. epidermidis</i>	epi	F	TTGTAAACCATTCTGGACCG	251	58
			R	ATGCGTGAGATACTTCTTCG		
2.	<i>S. saprophyticus</i>	sap	F	TTTTGGATGCGATAGATTGG	843	58
			R	TCTTCAGACTTTTCAAAGGC		

#### Thực hiện phản ứng PCR multiplex

Mastermix 12,5  $\mu$ L (10 mmol Tris-HCL (pH 8,3), 200  $\mu$ M cho mỗi loại dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,625 unit Taq DNA polymerase. Mồi (epi F 10pmol: 0,25  $\mu$ L, epi R 10 pmol: 0,25  $\mu$ L, sap F 10 pmol: 0,25  $\mu$ L, sap R 10 pmol: 0,25  $\mu$ L). Mẫu DNA: 5  $\mu$ L; Nước cất vô trùng PCR vừa đủ thể tích 25  $\mu$ L (Gribaldo *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2018).

Chu trình luân nhiệt như sau: 1 chu kỳ biến tính (95°C/5 phút); 30 chu kỳ tổng hợp DNA (95°C/30 giây; 56°C/30 giây; 72°C/40 giây) và bước tổng hợp cuối cùng 72°C/2 phút (Martineau *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2018).



**Hình 1. Hình ảnh kết quả điện di phát hiện sản phẩm PCR**

Lane 1: *S. epidermidis* 251 bp, Lane 2: *S. saprophyticus* 843 bp.

**Phương pháp xử lý số liệu**

Xử lý các số liệu thu thập được bằng phương pháp thống kê y học. Các thông số thống kê, tính toán trong nghiên cứu các thông số được trình bày dưới dạng số lượng và tỷ lệ phần trăm.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Các chủng vi khuẩn phân lập được trên da người khỏe mạnh**

Theo bảng 2 cho thấy các cầu khuẩn gram dương phân lập được đều là các Staphylococci, trong đó chiếm tỷ lệ cao nhất là *S. epidermidis* (51,4%), tiếp đó là *S. saprophyticus* (28,7%), các CoNS khác (14,5%) và *S. aureus* (4,4%). Như vậy, *S. epidermidis* chiếm tỷ lệ lớn trong các loại vi khuẩn phân lập được.

**Bảng 2. Các loại cầu khuẩn Gram dương phân lập được**

TT	Vi khuẩn	Số lượng	Tỷ lệ (%)
1	Coagulase (+)	11	4,4
2	<i>S. epidermidis</i>	128	51,4
3	<i>S. saprophyticus</i>	74	29,7
4	CoNS khác	36	14,5
<b>Tổng cộng</b>		<b>249</b>	<b>100,0</b>

Theo bảng 3 cho thấy các staphylococci được định danh bằng phương pháp truyền thống dựa vào nhuộm Gram, tính chất catalase dương tính, làm đông huyết tương, lên men mannitol và tính đề kháng novobiocin. Các tính chất về nhuộm Gram, catalase, coagulase đều phù hợp ở tỷ lệ 100,0% số chủng Staphylococci định danh, còn các tính chất khác dùng để phân loại *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* và các CoNS khác nên tỷ lệ khá khác biệt. CoNS khác có tính chất lên men mannitol như *S. saprophyticus* nhưng lại nhạy cảm novobiocin. Như vậy dựa vào loạt tính chất làm đông huyết tương, lên men mannitol và tính đề kháng novobiocin chúng ta cơ thể phân loại 4 nhóm Staphylococci là *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* và các CoNS khác. Trong nghiên cứu này chúng tôi sẽ tập trung phân tích riêng các tính chất này cho các *S. epidermidis* và *S. saprophyticus*.

**Bảng 3. Tổng hợp tính chất sinh vật hóa học của các Staphylococci**

Vi khuẩn		<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	Coagulase (+)	Các CoNS khác
Cầu khuẩn Gram (+)	n	128	74	11	36
	%	100	100	100	100
Catalase	n	128	74	11	36
	%	100	100	100	100
Lên men mannitol	n	128	74	11	36
	(+)	0	60	5	35
	%	0	81,1	45	97
	(-)	128	14	6	1
	%	100	18,9	55	3
Tan máu	n	128	74	11	36
	(+)	24	18	8	12
	%	18,7	24	72,7	33
	(-)	104	56	3	24
	%	81,3	76	27,3	67
Coagulase	n	128	74	11	36
	(+)	0	0	11	0
	%	0	0	100	0
	(-)	128	74	0	36
	%	100	100	0	100

	n	128	74	11	36
	(+)	0	74	2	0
Novobiocin	%	0	100	18,2	0
	(-)	128	0	9	36
	%	100	0	81,8	100

Trong nghiên cứu của chúng tôi theo kết quả trên bảng 2, giống vi khuẩn *S. epidermidis* chiếm tỷ lệ cao nhất trong các loại vi khuẩn được phân lập trên da người khỏe mạnh (128/262 chủng vi khuẩn) với tỷ lệ 48,9% và giống vi khuẩn *S. saprophyticus* (74/262 chủng vi khuẩn) chiếm tỷ lệ 28,2%. Trong khi đó, vi khuẩn *S. coagulase* dương tính (*S. aureus*) chỉ chiếm 4,2% (11/262 chủng vi khuẩn). Kết quả này phù hợp với rất nhiều nghiên cứu ở Việt Nam cũng như trên thế giới khi ghi nhận vị trí quan trọng của *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* (Jarlov *et al.*, 1994). Các vi khuẩn thường trú ở da thì *S. epidermidis* là loài thường gặp nhất 90% trong các loại vi khuẩn hiếu khí, ước tính có khoảng  $10^3$  đến  $10^4$  vi khuẩn/cm<sup>2</sup> da (Nguyễn Thanh Bảo, 2014)).

Theo nghiên cứu của Trần Thanh Loan và đồng tác giả (2016), khi nghiên cứu 80 chủng của các staphylococci được định danh và xác định độc lực bằng phương pháp truyền thống dựa vào tiêu bản nhuộm Gram, tính chất Catalase dương tính, làm đông huyết tương, lên men đường mannitol, tính chất tan máu trên môi trường thạch máu và khuẩn lạc có sắc tố màu vàng. Dựa vào các tính chất này, chúng ta đã có thể định danh khá chính xác *S. aureus* và các staphylococci coagulase âm tính. Thời gian để định danh hết 40-48 giờ. Nghiên cứu này có kết quả và định hướng khá tương đồng về phân lập tính chất vi sinh vật cũng như thời gian phân lập của chúng tôi.

Theo nghiên cứu của Kloos, Schleifer (1975), tụ cầu khuẩn thường chiếm hơn 50% trong số vi khuẩn được phân lập từ đầu, mũi và nách và từ 10 đến 70% trong số vi khuẩn được phân lập từ chân và tay. Chúng ta cũng đã biết vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *S. epidermidis* là những loài staphylococci phổ biến và cư trú khá bền vững nên thường được phân lập từ mũi, trong khi *S. epidermidis* và *S. hominis* là những loài staphylococci phổ biến được phân lập từ da vùng nách, da đầu, da chân và da tay. Vi khuẩn *S. capitis* thường được phân lập từ da đầu và da tay, còn *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* và một loài không xác định thường được phân lập từ cả da đầu, da chân và da tay. Như vậy các nghiên cứu phân lập staphylococci trên da người khỏe mạnh có sự xuất hiện các chủng tương đồng với các chủng trong nghiên cứu của chúng tôi.

Theo nghiên cứu Phan Thị Lụa và đồng tác giả (2023) khi khảo sát vi khuẩn trên bàn tay nhân viên y tế đã phân lập được *S. aureus* trên 17/39 bàn tay nhân viên y tế, chiếm 43,6%, các loài CoNS cũng chiếm tỷ lệ cao (83 chủng/37 bàn tay), tỷ lệ bàn tay xuất hiện vi khuẩn *S. epidermidis* là 53,8%. Nghiên cứu này có kết quả với nghiên cứu chúng tôi là loài *S. epidermidis* chiếm tỷ lệ cao nhất. Kết quả nghiên cứu của Sadiya và đồng tác giả (2019) tại bệnh viện Kano, Nigeria, 54 mẫu ở tai có 46 mẫu *S. aureus* (85%) và 08 mẫu CoNS (15%).

Các tác giả Kloos, Musselwhite (1975) khi nghiên cứu xác định, định danh bằng sinh vật học với 939 chủng tụ cầu trong nghiên cứu được phân lập từ da khỏe mạnh của hai nhóm người. Chúng bao gồm 778 chủng được phân lập từ 20 người sống ở Raleigh, NC, và 161 chủng được phân lập từ 20 người sống ở Somerville và New Brunswick, NJ. Tất cả bảy chủng trên được xác định là thuộc loài *S. aureus*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. wareri*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, hoặc *S. capitis*. Nghiên cứu này và nghiên cứu chúng tôi cho thấy các loài trên da người khỏe mạnh có các loài *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, còn các loài khác thì chúng tôi không đưa vào phân lập và định danh.

Theo trình bày ở bảng 4, các chủng staphylococci được định danh bằng phương pháp truyền thống dựa vào nhuộm Gram, tính chất catalase dương tính, làm đông huyết tương, lên men mannitol và tính đề kháng novobiocin. Các tính chất về nhuộm Gram, catalase, coagulase đều phù hợp ở tỷ lệ 100,0% số chủng staphylococci định danh, còn các tính chất khác dùng để phân loại *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* và các CoNS khác nên tỷ lệ khá khác biệt. CoNS khác có tính chất lên men mannitol như *S. saprophyticus* nhưng lại nhạy cảm novobiocin. Như vậy dựa vào loạt tính chất làm đông huyết tương, lên men mannitol và tính đề kháng novobiocin chúng ta cơ thể phân loại 4 nhóm Staphylococci là *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* và các CoNS khác.

Đối chiếu với nghiên cứu của các tác giả khác như ghi nhận ở bảng dưới đây, chúng tôi nhận thấy có thể dựa vào các tính chất sinh vật học để định danh *S. aureus*, *S. epidermidis* species group và *S. saprophyticus* species group gồm nhuộm Gram, tính chất catalase dương tính, làm đông huyết tương, lên men mannitol và tính đề kháng novobiocin.

**Bảng 4. Tính sinh vật hóa học của một số staphylococci (Sadiya *et al.*, 2019)**

Giống vi khuẩn	Nhuộm gram	Catalase	Coagulase	Tan máu	Lên men mannitol	Novobiocin
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	+	+	-	-	-	+
<i>S. saprophyticus</i>	+	+	-	-	-	-

Theo nghiên cứu De Paulis và cộng sự (2003) năm thử nghiệm để xác định loài *Staphylococci* âm tính với Coagulase trong lâm sàng, 201 chủng trong đó 101 chủng *S. epidermidis* (50,5%) chiếm tỷ lệ cao nhất, xếp thứ 3 là 32 chủng *S. saprophyticus* (16,0%). Theo Leven và đồng tác giả (1995), phương pháp nhanh chóng và tiết kiệm để xác định loài *Staphylococci* âm tính với Coagulase có ý nghĩa lâm sàng, định danh bằng phương pháp truyền thống 444 mẫu trong đó 304 chủng *S. epidermidis* (69,1%) với tỷ lệ cao nhất và 1 chủng *S. saprophyticus* (0,2%). Việc dựa vào một số tính chất sinh vật hoá học như trên để định danh sinh vật học các CoNS thật sự có ý nghĩa lâm sàng vì việc định loài chỉ cần ở mức độ như vậy là đã có giá trị. Vì vậy ở mức độ không đòi hỏi yêu cầu cao về trang thiết bị, không yêu cầu khắt khe về mặt kỹ thuật, có thể cho kết quả khá nhanh (có thể từ 36-48 giờ), như vậy có thể đáp ứng nhu cầu chẩn đoán vi sinh vật ở ngay tuyến huyện.

**Định danh *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bằng phương pháp PCR**

Theo bảng 5 thì tỷ lệ phân lập bằng kỹ thuật PCR vi khuẩn *S. epidermidis* 52 chủng trong 128 chủng chiếm tỷ lệ 40,6% và vi khuẩn *S. saprophyticus* là 18 chủng trong 74 chủng chiếm tỷ lệ 24,3% các chủng vi khuẩn này được phân lập và định danh bằng phương pháp sinh vật hóa học.

**Bảng 5. Kết quả phân lập bằng phương pháp PCR**

TT	Vi khuẩn	Dương tính		Âm tính		Tổng
		n	%	n	%	
1	<i>S. epidermidis</i>	52	40,6	76	59,4	128
2	<i>S. saprophyticus</i>	18	24,3	56	75,7	74
<b>Tổng cộng</b>		<b>70</b>	<b>34,7</b>	<b>132</b>	<b>65,3</b>	<b>202</b>

Trong nghiên cứu của chúng tôi, theo kết quả trình bày trên bảng 4 thì tỷ lệ định danh bằng kỹ thuật PCR với các vi khuẩn *S. epidermidis* là 52 chủng chiếm 40,6% (52/128) các chủng phân lập được định danh bằng phương pháp sinh vật hóa học và với vi khuẩn *S. saprophyticus* là 18 chủng chiếm tỷ lệ 24,3% (18/74) các chủng phân lập được định danh bằng phương pháp sinh vật hóa học. Kết quả này cũng giống như kết quả nghiên cứu John và đồng tác giả (1978), phân lập sinh vật học (coagulase và Dnase) trên 2426 chủng tụ cầu phân lập được 1142 chủng CoNS và được xác định bằng phương pháp PCR đa môi kết quả 68,4% là *S. epidermidis*, 1,3% là *S. saprophyticus* trong khi 30,3% là không thể phân loại. Tuy nhiên cũng có sự khác biệt so với nghiên cứu của chúng tôi khi chỉ có 40,6% số chủng *S. epidermidis*, còn *S. saprophyticus* trong nghiên cứu chỉ là 24,3% trong khi nghiên cứu John Jr và cộng sự có tỷ lệ là 1,3% các chủng *S. saprophyticus*, điều này được họ lý giải là nếu chỉ dựa vào coagulase và Dnase chưa đầy đủ tính chất để xác định loài *S. saprophyticus* (John *et al.*, 1978). Rõ ràng ở đây có sự khác biệt khá lớn giữa định danh bằng sinh vật hóa học và định danh bằng kỹ thuật PCR. Liên quan đến vấn đề này, chúng ta có thể giải thích như sau:

Trong phân loại các nhóm CoNS, các tụ cầu coagulase âm tính được xếp thành 5 nhóm, trong đó có 2 nhóm lớn là *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bao gồm nhiều vi khuẩn giống nhau và khác nhau về một số tính chất sinh vật học. Trong nhóm *S. epidermidis species* có 10 thành viên, trong đó có những thành viên thường gặp như *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*; những thành viên không phổ biến như *S. haemolyticus* hay *S. hominis*; một số thành viên hiếm/không xác định như *S. capitis*, *S. caprae*... Trong nhóm *S. saprophyticus species* có 11 thành viên, trong đó có những thành viên thường gặp như *S. saprophyticus*; còn lại là những thành viên hiếm gặp như *S. succinus* (Becker *et al.*, 2014)... Các thành viên trong các nhóm lớn này có thể giống nhau về tính chất sinh vật hoá học như không có coagulase, lên men hay không lên men mannit, đề kháng hay nhạy cảm với novobiocin, tan máu hay không tan máu trên môi trường thạch máu... Tuy nhiên, từng thành viên chắc chắn sẽ có một số khác biệt, vì vậy chúng ta mới có một số chủng không hoặc có tan máu, lên men hay không lên men mannitol... Do đó, khi lựa chọn môi để khuếch đại xác định *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* thì các cặp môi này chỉ đặc hiệu cho chủng vi khuẩn *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* cho nên sẽ có một tỷ lệ nhất định các chủng là thành viên khác trong nhóm chứ không phải là *S. epidermidis* và *S. saprophyticus*. Trong nghiên cứu này, trong số 128 chủng cầu khuẩn *S. epidermidis* định danh bằng sinh vật hoá học, tỷ lệ xác định bằng kỹ thuật PCR cầu khuẩn *S. epidermidis* là 52 chủng chiếm 40,6% và cầu khuẩn *S. saprophyticus* là 18 chủng chiếm tỷ lệ 24,3%; còn lại các chủng khác có thể nằm trong nhóm lớn *S. epidermidis species* và *S. saprophyticus species* nhưng là các thành viên khác nên không thể xác định bằng PCR đặc hiệu cho *S. epidermidis* và *S. saprophyticus*.

Việc lựa chọn cặp môi để định danh *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* là rất đặc hiệu. Ví dụ, nhóm tác giả Shintaro và đồng tác giả (2011) đã sử dụng loạt cặp môi cho từng giống CoNS cụ thể, nên có lẽ mức độ xác định sẽ đầy đủ và chính xác hơn. Đó là các cặp môi hom-F TACAGGGCCATTTAAAGACG; hom-R GTTTCTGGTGTATCAACACC 177bp cho *S. hominis*; epi-F TTGTAAACCATTCTGGACCG, epi-R ATGCGTGAGATACTTCTTCG 251bp cho *S. epidermidis*; aur-F TCGCTTGCTATGATTGTGG, aur-R GCCAATGTTCTACCATAGC 359bp cho *S. aureus*; hae-F TAGTGGTAGGCGTATTAGCC, hae-R ACGATATTTGCCATTCGGTG 434bp cho *S. haemolyticus*; cap-F ACTACGCCTATGATTATTGC, cap-R

GAYGCTTCTTTACCATAGGG 525bp cho *S. capitis*; lug-F TCCAATGATGGTAACGAGGC lug-R TTTTGCCTCGTTTTGTGC 695bp cho *S. lugdunensis*; sap-F TTTTGGATGCGATAGATTGG, sap-R TCTTCAGACTTTTCAAAGGC 843bp cho *S. saprophyticus*; war-F CGTTTGTAGCAAAACAGGGC, war-R GCAACGAGTAACCTTGCCAC 999bp cho *S. warneri*; rae-F TTGTTCTWGC ACTYATTGCG, rae-R TTTTATAGAACAGGGTCGAC 1,227bp cho *S. caprae*. Chúng tôi chỉ định danh sinh vật học cho 2 nhóm lớn *S. epidermidis* species và *S. saprophyticus* species và định danh PCR cho 2 giống là *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* nên nhiều thành viên trong nhóm lớn sẽ không xác định được bằng kết quả PCR.

Như vậy, việc chúng tôi lựa chọn cặp mồi như trên chỉ định danh được *S. epidermidis* trong khi nhóm *S. epidermidis* species có 10 thành viên, thì những thành viên như *S. lugdunensis*; *S. haemolyticus* hay *S. hominis*; *S. capitis*, *S. caprae*...sẽ không định danh được với cặp mồi của chúng tôi lựa chọn. Tương tự trong nhóm *S. saprophyticus* species có 11 thành viên, trong đó có những thành viên thường gặp như *S. saprophyticus*; còn lại là những thành viên hiếm gặp như *S. succinus* thì cũng không định danh được với cặp mồi ở trên.

Xét về ý nghĩa lâm sàng và định danh bằng kỹ thuật PCR thì việc định danh bằng các tính chất sinh vật hoá học có ý nghĩa khi không yêu cầu cao về trang thiết bị, không yêu cầu khắc khe về mặt kỹ thuật, có thể cho kết quả khá nhanh (có thể từ 36-48 giờ), như vậy có thể đáp ứng nhu cầu chẩn đoán vi sinh vật ở ngay tuyến huyện. Tuy nhiên, về mặt nghiên cứu và đánh giá dịch tễ học phân tử thì việc định danh bằng PCR cũng rất quan trọng. Trong nghiên cứu này, chúng ta tính đến mức độ tương đồng của 2 kỹ thuật chẩn đoán vi khuẩn và cần nhắc đến ý nghĩa lâm sàng và mục đích của nghiên cứu sâu về vi khuẩn học. Thật sự kỹ thuật Multiplex-PCR mà chúng tôi thực hiện với việc lựa chọn 2 cặp mồi để định danh *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* là một phương pháp nhanh chóng và chính xác để xác định loài tụ cầu khuẩn *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* khi phòng xét nghiệm có trang bị các phương tiện chẩn đoán phân tử.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu định danh *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* trên da người khỏe mạnh bằng phương pháp sinh vật học và kỹ thuật PCR tại Bệnh viện Trường Đại học Y-Dược Huế đã phân lập và định danh 128 chủng *S. epidermidis* và 74 chủng *S. saprophyticus* dựa vào các đặc điểm sinh vật học. Kết quả định danh bằng PCR thì xác định được *S. epidermidis* 52/128 chủng chiếm 40,6% và *S. saprophyticus* là 18/74 chủng chiếm tỷ lệ 24,3%. Phương pháp PCR cho kết quả nhanh chóng, đáng tin cậy để phát hiện *S. epidermidis* và *S. saprophyticus*. Tuy nhiên, định danh hiện *S. epidermidis* và *S. saprophyticus* bằng các tính chất sinh vật hoá học không đòi hỏi yêu cầu cao về trang thiết bị, không yêu cầu khắc khe về mặt kỹ thuật, có thể cho kết quả khá nhanh (có thể từ 36-48 giờ), cũng có thể đáp ứng nhu cầu chẩn đoán vi sinh vật ở ngay tuyến huyện.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Becker K, Heilmann C, Peters G (2014) Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 27(4): 870-926.
- Cunha MdLR, Sinzato YK, Silveira LV (2004) Comparison of Methods for the Identification of Coagulasenegative *Staphylococci*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 99(8): 855-860.
- De Paulis Adriana N, Predari Silvia C, Chazarreta Carlos D, Santoianni Jorge E (2003) Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative *Staphylococci*. *J Clin Microbiol* 41(3): 1219-1224.
- Gribaldo S, Cookson B, Saunders N, Marples R, Stanley J (1997) Rapid identification by specific PCR of coagulase-negative Staphylococcal species important in hospital infection. *The Pathological Society of Great Britain and Ireland* 46: 45-53.
- Jarlov JO, Nissen B, Rosdahl VT, Espersen F (1994) Identification of coagulase-negative staphylococci and typing of *Staphylococcus epidermidis* by a 4 h micromethod. *APMIS* 102(1-6): 272-278.
- John JF, Gramling PK, O'Dell NM (1978) Species identification of coagulase-negative staphylococci from urinary tract isolates. *J Clin Microbiol* 8(4): 435-437.
- Kim J, Hong J, Lim JA, Heu S, Roh E (2018) Improved multiplex PCR primers for rapid identification of coagulase-negative staphylococci. *Arch Microbiol* 200(1): 73-83.
- Kloos WE, Schleifer KH (1975) Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 1(1): 82-88.
- Kloos WE, Musselwhite MS (1975) Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* Species and other aerobic bacteria on human skin. *Applied Microbiology* 30(3): 381-395.
- Lê Văn Phụng (2009) Tụ cầu, Vi sinh Y học. Nhà xuất bản Y học: 45-62.
- Leven M, Verhoeven J, Pattyn SR, Goossens H (1995) Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* 33: (5) 1060-1063.
- Martineau F, Picard FJ, Ménard C, Roy PH, MarcOuellette, Bergeron aG (2000) Development of a rapid PCR assay specific for *Staphylococcus saprophyticus* and application to direct detection from urine samples. *J Clin Microbiol* 38(9): 3280-3284.
- Nguyễn Thanh Bảo (2014) Tụ cầu, Vi khuẩn Y học. Nhà xuất bản Y học.
- Nguyễn Viêt Quang (2013) Tỷ lệ vi khuẩn kháng thuốc ở bệnh nhân viêm phổi do thở máy tại phòng hồi sức sau mổ ở bệnh viện trung ương Huế. *Y học thực hành* 12: 36-39.
- Phan Thị Lua, Hoàng Thị An Hà, Cao Trường Sinh (2023) Khảo sát hệ vi khuẩn bàn tay của nhân viên y tế bệnh viện trường Đại học Y Khoa Vinh năm 2021. *Tạp chí Y học Việt Nam* 524(1A): 261-264.

Rupp ME, Fey PD (2015) 197 - *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative *Staphylococci*. Mandell, Douglas, and Bennett's *Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*, Bennett JE, Dolin R & Blaser MJ, editors.: 2272-2282.e2275. W.B. Saunders, Philadelphia.

Sadiya M, Ibrahim, Ismail A, Sani M, Yahaya, Muhammad A (2019) *Isolation and characterization of staphylococcus species from clinical samples obtained from some hospitals in Kano Metropolis, Nigeria*. *ARC Journal of Urology* 4(3): 1-6.

Shintaro H, Takashi S, Kyoko K-A, Keiichi H (2011) Rapid and accurate identification of human-associated staphylococci by use of multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 49(10): 3627-3631.

Trần Thanh Loan, Trương Đình An Sơn, Trần Đình Bình (2016) Nghiên cứu chẩn đoán nhanh *Staphylococci* và tính đề kháng Methicillin của chúng bằng kỹ thuật PCR đa mồi. *Kỷ yếu hội nghị KHCN tuổi trẻ các trường đại học, cao đẳng Y-Dược Việt Nam lần thứ XVIII-2016*: 512-551.

## STUDY ON IDENTIFICATION OF STAPHYLOCCOCUS EPIDERMIDIS AND STAPHYLOCCOCUS SAPROPHYTICUS ON HEALTHY HUMAN SKIN USING BIOLOGICAL METHODS AND PCR TECHNIQUE

Vo Dai Hoc<sup>2</sup>, Duong Thi Ngoc Mai<sup>2</sup>, Tran Dinh Binh<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

<sup>2</sup>Students of Master's Degree in Biomedicine, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

### SUMMARY

The study was conducted according to a cross-sectional descriptive method through culturing, isolating and identifying bacterial strains *S. epidermidis* and *S. saprophyticus* on healthy human skin using traditional methods and multiplex PCR techniques at the Department of Microbiology, student at Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital, comparing the value of two techniques. Identified 128 strains of *S. epidermidis* and 74 strains of *S. saprophyticus* based on biological characteristics. The results of identification by PCR identified 52/128 strains of *S. epidermidis*, accounting for 40.6%, and 18/74 strains of *S. saprophyticus*, accounting for 24.3%. The PCR method provides quick, reliable results for detecting *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*. However, the current identification of *S. epidermidis* and *S. saprophyticus* by biological and chemical properties does not require high equipment requirements, does not require strict techniques, and can give results quite quickly. (can be from 36-48 hours), can also meet the need for microbiological diagnosis at the district level. Identification of *S. epidermidis* and *S. saprophyticus* by biological and chemical properties gives results for the general group of bacteria, while the PCR method specifically identifies the bacterial strains *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*.

**Keywords:** *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, PCR, isolation and identification.

\* Author for correspondence: Tel: 0913363930; Email: tdbinh@huemed-univ.edu.vn