

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO QUE THỬ PHÁT HIỆN NHANH ĐỘC TỐ RUỘT NHÓM B CỦA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

Nguyễn Thị Hoài Thu¹, Lê Trọng Văn², Nghiêm Ngọc Minh¹,✉

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Kỹ thuật hóa học, sinh học và tài liệu nghiệp vụ, Bộ Công an

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nghieminh@igr.ac.vn

Ngày nhận bài: 21.3.2017

Ngày nhận đăng: 20.7.2017

TÓM TẮT

Staphylococcus aureus là một trong số những tác nhân vi sinh vật gây ngộ độc thực phẩm. Hơn hai mươi loại siêu kháng nguyên do *S. aureus* sản sinh ra. Trong đó, Staphylococcal enterotoxin B (SEB) là nguyên nhân phổ biến gây ngộ độc thực phẩm. Chẩn đoán và phát hiện SEB bằng que thử nhanh dạng sắc ký miễn dịch (Immuno-chromatography test - ICT hay lateral flow test strip - LFTS) đã và đang được các nhà nghiên cứu quan tâm với các ưu điểm cho kết quả nhanh, thao tác đơn giản, không đòi hỏi cán bộ sử dụng phải được đào tạo chuyên môn. Ngoài ra, LFTS có thời gian sử dụng dài và không yêu cầu bảo quản lạnh nên rất thích hợp để sử dụng ở những nước đang phát triển, các cơ sở chăm sóc cấp cứu nhỏ, ở vùng sâu vùng xa và ngoài chiến trường. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chế tạo và thử nghiệm thành công que thử SEB ở qui mô phòng thí nghiệm. Que thử có khả năng phát hiện độc tố SEB ở nồng độ là 10 ng/ml, có độ nhạy và độ đặc hiệu cao tương ứng là 100% và 96,66%. Que thử phát hiện nhanh độc tố SEB không phản ứng chéo với các độc tố khác như SEA, SEC, SED và SEE, đọc kết quả trong khoảng thời gian là 10 phút và có chất lượng tương đương với các que thử thương mại. Việc tạo ra que thử phát hiện độc tố SEB của *S. aureus* dạng sắc ký miễn dịch có ý nghĩa quan trọng trong công tác vệ sinh an toàn thực phẩm, phòng bệnh và bảo vệ người tiêu dùng.

Từ khóa: Lateral flow test strip, que thử sắc ký miễn dịch, que thử SEB, SEB, *Staphylococcus aureus*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nguyên nhân gây ngộ độc thực phẩm do vi sinh vật chiếm tỷ lệ cao từ 32,8% - 55,8% và cao hơn hẳn so với các nguyên nhân khác. Trong đó, *S. 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* (Rosec, Gigaud, 2002, Normanno *et al.*, 2005). *S. aureus* sản sinh ra hơn 20 loại độc tố ruột (enterotoxin) từ SEA đến SEE, từ SEG đến SER và SEU - trong đó có SEB (Martin *et al.*, 2004). Chính khả năng tạo ra nhiều yếu tố độc lực, phân bố rộng và sức đề kháng mạnh đã khiến tụ cầu khuẩn *S. aureus* trở thành tác nhân nguy hiểm, tác nhân chính gây bệnh ở người (Balaban, Rasooly, 2000). SEB hoàn chỉnh bao gồm một trình tự tín hiệu (signal peptide) gồm 27 amino acid ở đầu N (Jones, Khan, 1986). SEB ở dạng hoạt động là 1 chuỗi polypeptide đơn gồm 239 amino acid với khối lượng phân tử khoảng 28,336 kDa. Protein SEB hình thành 2 vùng cấu trúc đặc biệt phức tạp được đóng gói nhỏ

gọn chặt chẽ, cho phép SEB chống lại sự tác động của các protease trong dịch ruột, dạ dày như trypsin, chymotrypsin và papain. SEB dễ dàng phát tán trong không khí, trong nước uống, trong thức ăn. Từ 3 - 12 giờ sau khi hít phải SEB với liều lượng thấp, các triệu chứng giống cúm sẽ xảy ra như sốt cao (khoảng 40°C đến 41°C), ớn lạnh, khó thở, ho khan, đau cơ, nhức đầu, nôn và buồn nôn có thể kèm theo tiêu chảy. Nồng độ hít phải càng cao ảnh hưởng càng nghiêm trọng như: đau thắt ngực, suy nhược, phù phổi hoặc có thể gây tử vong. Sau 2- 6 giờ, nếu ăn phải độc tố ruột SEB, bệnh nhân sẽ tăng tiết nước bọt, buồn nôn, nôn mửa, đau bụng và tiêu chảy (Ulrich *et al.*, 1997). Bởi thế cho nên, việc phát triển các kỹ thuật có khả năng phát hiện nhanh siêu kháng nguyên SEB đóng một vai trò cực kỳ quan trọng và ý nghĩa to lớn trong công tác phòng bệnh. Có nhiều phương pháp phát hiện SEB và các gen SE khác như kỹ thuật PCR (Wilson *et al.*, 1991), PCR đa mồi (Multiplex PCR) (Shylaja *et al.*, 2010); PCR định lượng theo thời gian (real-time PCR) (Rodríguez *et*

al., 2016); PCR phiên mã ngược (reverse-transcriptase PCR hay RT-PCR) (Matsui *et al.*, 1997). Các phương pháp này có độ nhạy và độ đặc hiệu khá cao, nhưng không cơ động, khá phức tạp và đòi hỏi cán bộ nghiên cứu có chuyên môn, kỹ thuật. Một số phương pháp miễn dịch chẩn đoán mầm bệnh thông qua phức hợp kháng nguyên – kháng thể như: Sử dụng phương pháp ELISA phát hiện SEB trong phomat ở nồng độ thấp từ 0,1 đến 1 ng/ml nhưng quá trình phát hiện hoàn thành mất 3,5 giờ (Celine *et al.*, 1990); Biosensor sợi quang học (fiber-optic biosensor) (King *et al.*, 1999), Sensor cộng hưởng sinh chất bề mặt (surface plasmon resonance sensor) phát hiện độc tố SEB trong sữa dưới 1 ng/ml (Marjorie, 2005), biosensor điện áp (piezoelectric (PZ) biosensor) độc tố SEB được phát hiện ở ngưỡng là 2,5 µg/ml (Lin *et al.*, 2003), phương pháp cảm biến sinh học điện dung phát hiện ở nồng độ tối thiểu là 0,3 pg/ml (Mahmoud *et al.*, 2009); huỳnh quang miễn dịch liposome đánh dấu trên cột sắc ký miễn dịch, phát hiện ở nồng độ 20 pg/ml (Nathalie *et al.*, 2008); thử nghiệm miễn dịch hóa điện từ sandwich, phát hiện tới 1 ng/ml SEB (Madhu *et al.*, 2007); huỳnh quang điện hóa - từ miễn dịch, phát hiện 0,1 – 100 ng/ml (Todd *et al.*, 2000); phương pháp gắn hạt nano vàng - dựa trên tăng cường cảm biến miễn dịch hóa huỳnh quang, phát hiện được gần 0,01 ng/ml SEB trong thời gian khoảng 10 phút (Minghui *et al.*, 2009). Các phương pháp này phát hiện nhanh SEB ở nồng độ thấp, trong thời gian ngắn, tuy nhiên nhược điểm là phải tiến hành tại các phòng thí nghiệm, đặc biệt phải cần các trang thiết bị hiện đại đi kèm và yêu cầu người thực hiện phải có kỹ thuật, cẩn thận và chu đáo.

Trong những năm gần đây, LFTS đang là mối quan tâm hàng đầu của các nhà nghiên cứu và các nhà sản xuất bởi chi phí sản xuất thấp, dễ sử dụng và quan trọng hơn hết là được người dùng và cơ quan quản lý tin tưởng. Hơn nữa, LFTS có thời gian sử dụng dài và không yêu cầu bảo quản lạnh nên rất thích hợp để sử dụng ở những nước đang phát triển, các cơ sở chăm sóc cấp cứu nhỏ, ở vùng sâu vùng xa và ngoài chiến trường (Connelly *et al.*, 2008).

Que thử sắc ký miễn dịch là phương pháp phát triển nhất trong kiểm tra an toàn thực phẩm. Chúng được sử dụng rộng rãi để phát hiện độc tố (Moon *et al.*, 2012, Ching *et al.*, 2015) và tồn dư thuốc thú y (Gao *et al.*, 2014), phát hiện vi sinh vật (Hagström *et al.*, 2015) và thực phẩm biến đổi di truyền (Terry *et al.*, 2002).

Trên thế giới, các nhóm nghiên cứu như Rong-Hwa (2010), Tsui (2013) và Gholamzad (2015) đã có

một số nghiên cứu sử dụng thành công phương pháp này để phát hiện độc tố SEB của *S. aureus*. Tại Việt Nam Trần Thị Sao Mai và các đồng tác giả (2015) đã nghiên cứu thành công que thử phát hiện độc tố SEB trong sữa theo phương pháp sắc ký miễn dịch dạng cạnh tranh. Nhưng các công trình công bố trên thế giới và tại Việt Nam kể trên đều sử dụng nguồn nguyên liệu là kháng nguyên SEB được mua thương mại. Trong nghiên cứu này, các nguyên liệu như kháng nguyên, kháng thể đều được tự sản xuất từ vi khuẩn *S. aureus* gây ngộ độc thực phẩm tại Việt Nam nên sẽ chủ động trong việc cung cấp nguyên liệu, độ đặc hiệu cao và giá thành thấp phù hợp với kinh tế trong nước (Nghiem Ngọc Minh *et al.*, 2013; 2016).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Kháng thể phát hiện (Detection Antibody): Kháng thể đơn dòng của chuột kháng độc tố SEB (được sản xuất từ Đề tài cấp Nhà nước KC.04.14/11-15.)

Kháng thể bắt giữ (Capture antibody): Kháng thể đa dòng thỏ kháng SEB (được sản xuất từ Đề tài cấp Nhà nước KC.04.14/11-15.)

Kháng thể kiểm tra: Kháng thể của dê kháng IgG của chuột (Sigma, Mỹ).

Có 3 kháng thể được gắn lên màng: kháng thể phát hiện (KT1), kháng thể bắt giữ (KT2) và kháng thể kiểm tra (KT3). Kháng thể phát hiện được gắn với hạt vàng, sau đó gắn lên màng chứa cộng hợp (Conjugate pad). Kháng thể bắt giữ được gắn lên màng ở vị trí đường kiểm tra (test line). Kháng thể kiểm tra gắn lên màng ở vị trí đường đối chứng (control line).

Kháng nguyên tái tổ hợp rSEA, rSEB, rSEC, rSED, rSEE được mua của hãng Toxin Technology (Mỹ) để sử dụng cho các thử nghiệm đánh giá que thử.

Test SEB thương mại sử dụng để so sánh được mua của hãng Tetracore (Mỹ).

PHƯƠNG PHÁP

Phương pháp cộng hợp kháng thể kháng SEB với hạt vàng

Dung dịch keo vàng 40 nm và kháng thể đơn dòng kháng SEB nồng độ 2 mg/ml được chuẩn bị,

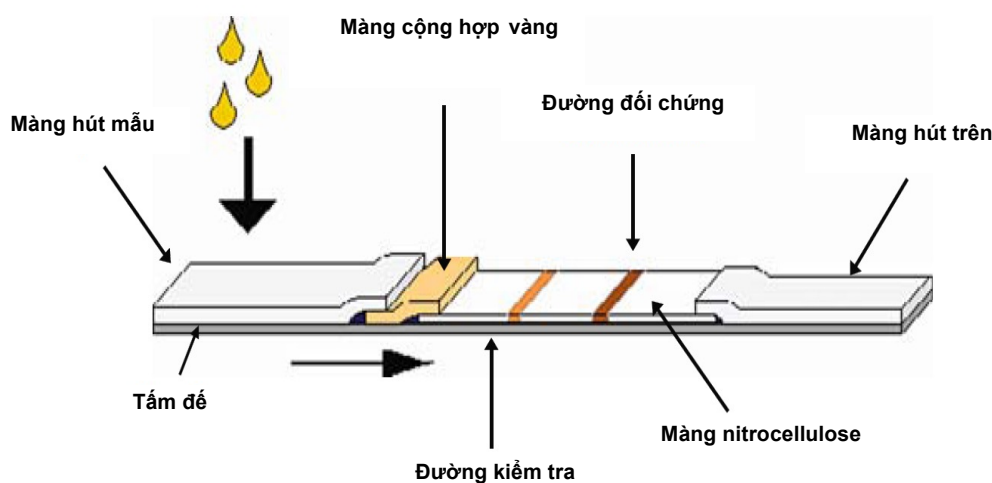
trong đó pH của dung dịch keo vàng được cân bằng với điểm đẳng điện (pI) của dung dịch kháng thể. Phản ứng cộng hợp được thực hiện: Lấy 10 ml dung dịch keo vàng cho vào cốc đặt trên máy khuấy từ, bổ sung dung dịch kháng thể đơn dòng có nồng độ 2 mg/ml vào dung dịch nano vàng với tỷ lệ 1:50 rồi khuấy đều dung dịch 30 phút với tốc độ 50 vòng/phút, cộng hợp ở nhiệt độ 25°C trong 2 giờ. Khả năng liên kết giữa hạt nano vàng với kháng thể đơn dòng kháng SEB được kiểm tra bằng cách hút 100 µl dung dịch cộng hợp cho vào một ống effendorf, cho thêm 100 µl dung dịch NaCl 1M (theo tỷ lệ 1:1). Dung dịch giữ nguyên màu đỏ cho thấy điều kiện cộng hợp kháng thể kháng SEB với dung dịch keo vàng thành công. Sau đó, 1ml dung dịch BSA 5% được bổ sung vào dung dịch cộng hợp, lắc đều ở nhiệt độ phòng trong thời gian 16 giờ để khóa hết các liên kết còn dư thừa trên bề mặt của hạt nano vàng. OD của sản phẩm cộng hợp được kiểm tra. Sau đó, phức hệ cộng hợp kháng thể kháng SEB-hạt vàng 40 nm được bảo quản ở 4°C.

Phương pháp lấy mẫu

Hai mươi mẫu thực phẩm là xúc xích, kem, sữa và mẫu nước được mua ở một số cửa hàng thực phẩm, siêu thị tại Hà Nội, thành phố Hồ Chí Minh. Các mẫu này được lấy ngẫu nhiên, sau khi lấy được bảo quản ở 4°C đến khi phân tích.

Phương pháp chế tạo que thử nhanh

Đầu tiên, các loại màng được xử lý bằng các loại đệm thích hợp, sấy khô. Tiếp theo, kháng thể được trải lên màng, trên màng Nitrocellulose: Tại đường kiểm tra (Test line) trải kháng thể đa dòng thô kháng SEB nồng độ 1,5 mg/ml, trải trên màng với mật độ là 2 µl/cm; Tại đường đối chứng (Control line) trải kháng thể đa dòng IgG của dê kháng IgG của chuột nồng độ 9,8 mg/ml được hòa loãng bằng đệm PBS tới nồng độ 2 mg/ml và trải với lượng 2 µl/cm. Trên màng cộng hợp vàng: Trải kháng thể đơn dòng của chuột kháng độc tố SEB nồng độ 2 mg/ml cộng hợp hạt vàng OD₅₄₀=15, có mật độ trải là 3 µl/cm. Sau đó, các thành phần được cắt, lắp ráp hoàn thiện sản phẩm. Kết cấu của que thử SEB dạng sắc ký miễn dịch được trình bày trên hình 1.



Hình 1. Kết cấu của que thử SEB dạng sắc ký miễn dịch.

Phương pháp thử nghiệm que thử

Phương pháp kiểm tra phản ứng chéo

Các độc tố rSEA, rSEB, rSEC, rSED, rSEE thương mại được pha loãng trong đệm PBS 1X pH 7,4 ra các nồng độ 0 ng/ml; 10 ng/ml; 20 ng/ml; 30 ng/ml; 40

ng/ml; 60 ng/ml; 80 ng/ml và 100 ng/ml. Mỗi mẫu thử được lặp lại 10 lần và các lần thử được đọc kết quả.

Phương pháp thử nghiệm xác định độ nhạy, độ đặc hiệu và hiệu quả của KIT kiểm tra nhanh độc tố SEB

Các mẫu chứa độc tố SEB được chuẩn bị ở các

nồng độ như sau: 0 ng/ml; 2,5 ng/ml; 5 ng/ml; 7,5 ng/ml; 12,5 ng/ml; 15 ng/ml; 17,5 ng/ml. Mẫu được nhỏ vào cửa sổ nhỏ mẫu trên que thử, chờ đọc kết quả sau 10 phút và mỗi thử nghiệm được lặp lại 30 lần. Sau đó các kết quả thử nghiệm được lập bảng và tính toán các chỉ số kỹ thuật của que thử theo công thức (Wong, Harley, 2009).

Phương pháp thử nghiệm que thử SEB trên một số mẫu thực phẩm

Với 05 mẫu xúc xích mua ở cửa hàng hoặc siêu thị, lấy khoảng 10 g xúc xích mỗi mẫu cho vào cốc sạch dùng kéo cắt nhỏ sau đó bổ sung 15 ml nước vô trùng, tiếp tục sử dụng kéo đảo đều với mục đích nước thấm đều vào mẫu xúc xích, để hỗn hợp 5 phút.

Chuẩn bị mẫu dương tính với SEB trên mẫu xúc xích

Lấy 10 g xúc xích cho vào cốc thủy tinh sạch, dùng pipet lấy 20 µl protein SEB thương mại nồng độ 0,1 mg/ml bổ sung vào các mẫu xúc xích, dùng kéo cắt nhỏ và để mẫu 5 phút. Bổ sung 15 ml nước vô trùng, dùng kéo hoặc thìa thủy tinh khuấy đều để mẫu 10 phút. Lấy 300 µl dịch chiết nhỏ vào cửa sổ mẫu trên test thử sau đó đợi 10 phút đọc kết quả.

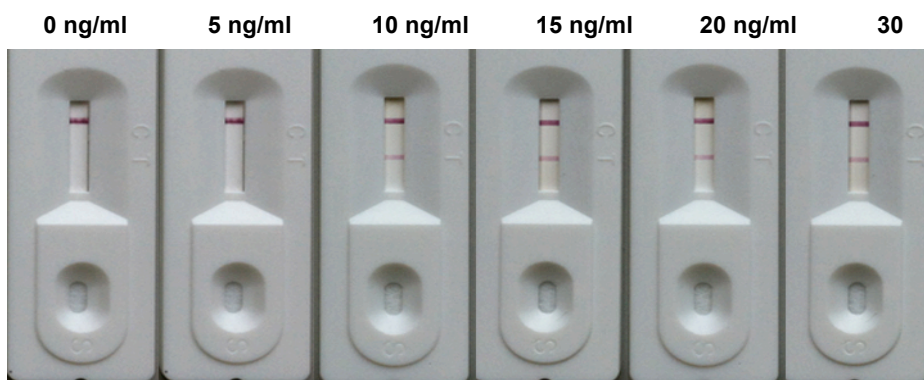
Các mẫu thực phẩm sau khi được xử lý trong đệm chiết mẫu, nhỏ khoảng 3 đến 5 giọt được hút nhỏ vào vị trí "S" trên cửa sổ nhỏ mẫu trên cassette,

chờ đọc kết quả sau 10 phút. Kết quả dương tính (trong mẫu chứa SEB) khi trên cửa sổ đọc kết quả xuất hiện 02 vạch màu đỏ tại vị trí T và C. Kết quả âm tính (trong mẫu không chứa SEB) khi trên cửa sổ đọc kết quả xuất hiện 01 vạch màu đỏ tại vị trí C.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Giới hạn phát hiện của que thử SEB

Que thử SEB được kiểm tra với các mẫu thử chứa độc tố SEB ở các nồng độ 0 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 15 ng/ml, 20 ng/ml và 30 ng/ml với số lần thử lặp lại 10 lần. Sau khoảng 10 phút, kết quả âm tính với nồng độ 5 ng/ml, trên que thử chỉ xuất hiện 1 vạch tại vùng đối chứng C (control). Đối với các mẫu chứa nồng độ SEB từ 10 ng/ml trở lên, que cho kết quả dương tính, thể hiện trên que thử xuất hiện 01 vạch ở vị trí T (test line) và 01 vạch ở vị trí vùng control line (Hình 2). Que thử phát hiện nhanh SEB có giới hạn phát hiện là 10 ng/ml, kết quả này cũng tương tự với công bố của Tsui (Tsui *et al.*, 2013) và Gholamzad (Gholamzad *et al.*, 2015). Que thử trong nghiên cứu này phát hiện được SEB ở nồng độ thấp hơn so với que thử phát hiện SEB trong sữa theo dạng sắc ký miễn dịch cạnh tranh với nồng độ là 30 ng/ml (Trần Thị Sao Mai *et al.*, 2015).



Hình 2. Thử nghiệm que thử SEB trên mẫu chứa nồng độ độc tố SEB khác nhau. C: Control line trái kháng thể IgG của dê kháng IgG chuột; T: Test line trái kháng thể đa IgG thô kháng SEB; S: Sample (cửa sổ nhỏ mẫu).

Độ nhạy, độ đặc hiệu và hiệu quả của que thử SEB

Các test nhanh dạng que thử sắc ký miễn dịch sau khi sản xuất đều phải được thử nghiệm, đánh giá

và xác định chỉ tiêu kỹ thuật cụ thể. Test phát hiện nhanh độc tố SEB sau khi sản xuất được kiểm tra các thông số kỹ thuật quan trọng như: độ nhạy, độ đặc hiệu, hiệu quả của test, giá trị dự đoán âm tính và giá trị dự đoán dương tính theo hướng dẫn của Wong và

Harley (2009). Giới hạn ngưỡng của test phát hiện nhanh độc tố SEB là 10 ng/ml, từ ngưỡng này tiến hành xác định độ nhạy, độ đặc hiệu của test. Các mẫu thử nghiệm được chuẩn bị như đã trình bày ở phần phương pháp, kết quả thống kê được thể hiện ở bảng 1. Với kết quả này chúng tôi đã xác định được chỉ tiêu kỹ thuật của test thử SEB có độ nhạy là

100%, độ đặc hiệu 96,66%, hiệu quả test đối với SEB là 98,095%, giá trị dự đoán dương tính là 95,745% và giá trị dự đoán âm tính là 100% (Bảng 2). Như vậy, que thử SEB tạo ra trong nghiên cứu của chúng tôi có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn so với công bố của Gholamzad với độ nhạy là 91% và độ đặc hiệu là 84% (Gholamzad *et al.*, 2015).

Bảng 1. Kết quả thử nghiệm test phát hiện SEB trên các mẫu có nồng độ SEB khác nhau.

STT	Độc tố SEB		Kết quả	
	Nồng độ SEB (ng/ml)	Số lần thử lặp lại (n)	Âm tính	Dương tính
1	0	30	30	0
2	2,5	30	30	0
3	5	30	30	0
4	7,5	30	26	4
5	12,5	30	0	30
6	15	30	0	30
7	17,5	30	0	30

Bảng 2. Kết quả phân tích xác định chỉ số kỹ thuật của test SEB

STT	Các thông số	Kết quả
1	Dương tính thật (TP)	90
2	Âm tính giả (FN)	0
3	Âm tính thật (TN)	116
4	Dương tính giả (FP)	4
5	Độ nhạy (Sensitivity) (%)=TP/(TP +FN)	100%
6	Độ đặc hiệu (Specificity)(%) = TN/(TN+FP)	96,66%

Thử nghiệm khả năng phản ứng chéo của test SEB với các độc tố SE khác

Một số độc tố SE giống nhau về cấu trúc vì thế việc thử nghiệm phản ứng chéo với các độc tố gần giống với đặc điểm của SEB như: SEA, SEC, SED, SEE là rất cần thiết để đánh giá khả năng áp dụng của test. Các độc tố SEA, SEB, SEC, SED, SEE được chuẩn bị với các nồng độ 0 ng/ml; 10 ng/ml; 20 ng/ml; 40 ng/ml; 60 ng/ml; 80 ng/ml và 100 ng/ml. Quá trình thử được lặp lại 10 lần đối với mỗi nồng

độ, thời gian đọc kết quả khoảng 10 phút. Kết quả thử nghiệm cho thấy chỉ có mẫu SEB tạo ra vạch đỏ tại đường kiểm tra, còn bốn mẫu SEA, SEC, SED, SEE không tạo ra vạch đỏ tại đường kiểm tra (Hình 3). Như vậy, que thử SEB không phản ứng chéo với các độc tố SE khác (từ A đến E).

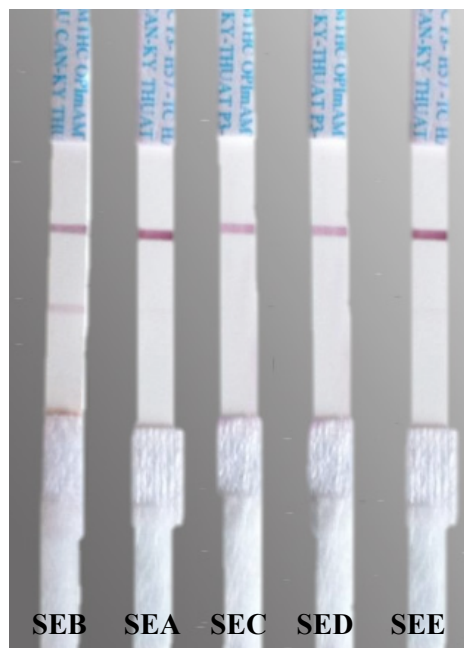
So sánh với test thương mại

Để kiểm tra đánh giá về chỉ tiêu kỹ thuật, giới hạn phát hiện của que thử độc tố SEB, chúng tôi tiến hành so sánh kết quả với test thương mại của hãng

Tetracore (Mỹ). Đây là hãng chuyên sản xuất các công cụ, phương tiện test nhanh phát hiện các tác nhân nguy hiểm thường được sử dụng trong chiến tranh sinh học. Mẫu chứa độc tố SEB được pha loãng ở các nồng độ khác nhau là 0 ng/ml; 5 ng/ml; 10 ng/ml; 20 ng/ml; 30 ng/ml; 40 ng/ml và 50 ng/ml. Số lần lặp lại 5 lần, thời gian đọc kết quả 10 phút. Kết quả thử nghiệm test thương mại được tổng hợp ở bảng 3.

Test phát hiện nhanh độc tố SEB thương mại của hãng Tetracore cho kết quả âm tính trên các mẫu chứa nồng độ SEB 0-5 ng/ml và cho kết quả dương tính với các mẫu chứa SEB có nồng độ ≥ 10 ng/ml tương đương với ngưỡng phát hiện test phát hiện nhanh SEB sản xuất trong nghiên cứu này. Test thương mại phát hiện nhanh độc tố SEB không phản ứng chéo với các độc tố SEA, SEC và SEE với nồng độ từ 5 ng/ml đến 50 ng/ml.

Từ các kết quả kiểm tra, xác định chỉ tiêu kỹ thuật cho thấy test thử độc tố SEB tạo ra trong nghiên cứu có chỉ tiêu kỹ thuật tương đương test thương mại của Mỹ. Test có chất lượng tốt, kết quả ổn định với thời gian đọc kết quả khoảng 10 phút.



Hình 3. Thử nghiệm phản ứng chéo của test phát hiện độc tố SEB.

Bảng 3. Kết quả thử nghiệm test phát hiện nhanh độc tố SEB thương mại của hãng Tetracore (Mỹ).

STT	Nồng độ (ng/ml)	Số lần thử lặp lại	SEB		SEA		SEC		SED		SEE	
			-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
1	0	5	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
2	5	5	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
3	10	5	0	5	5	0	5	0	5	0	5	0
4	20	5	0	5	5	0	5	0	5	0	5	0
5	30	5	0	5	5	0	5	0	5	0	5	0
6	40	5	0	5	5	0	5	0	5	0	5	0
7	50	5	0	5	5	0	5	0	5	0	5	0

Chú thích: +: Kết quả dương tính; -: Kết quả âm tính.

Kết quả thử nghiệm test SEB trên một số mẫu thực phẩm

Để có thể ứng dụng test phát hiện SEB ngoài thực tế cần phải tiến hành kiểm tra, đánh giá, thử nghiệm bộ test trên các mẫu thực phẩm và mẫu nước uống. Nghiên cứu đã thử nghiệm test phát hiện nhanh độc tố SEB của *S. aureus* dạng sắc ký miễn

dịch trên các mẫu thực phẩm như xúc xích; kem; sữa và nước.

Kết quả thử nghiệm test SEB trên mẫu xúc xích

Thống kê kết quả cho thấy test phát hiện nhanh độc tố SEB cho kết quả âm tính với 05 mẫu xúc xích mua trên thị trường và cho kết quả dương tính khi bổ sung thêm độc tố SEB vào mẫu xúc xích. Như vậy,

một số thành phần, hóa chất chiết từ mẫu xúc xích không ảnh hưởng tới kết quả và khả năng hoạt động của test.

Kết quả thử nghiệm test SEB trên mẫu kem, sữa và mẫu nước

Thử nghiệm cũng được tiến hành tương tự như đối với mẫu xúc xích, chỉ khác ở khâu chuẩn bị mẫu. Kết quả sau khi thử nghiệm với ba mẫu trên là: test phát hiện nhanh độc tố SEB cho kết quả âm tính với các mẫu kem, sữa và mẫu nước mua trên thị trường và đều cho kết quả dương tính khi bổ sung thêm độc tố SEB. Từ các kết quả kiểm tra, xác định chỉ tiêu kỹ thuật của test trên cho thấy test phát hiện nhanh độc tố SEB sử dụng cặp kháng thể sản xuất trong nước có kết cấu gọn nhẹ dễ sử dụng với độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Test có kết quả ổn định với thời gian đọc kết quả nhanh có thể áp dụng để kiểm tra các mẫu nước, mẫu thực phẩm trong môi trường sau khi được hoàn thiện và đăng ký, cấp phép lưu hành.

Đánh giá độc lập sản phẩm que thử phát hiện nhanh độc tố SEB

Bộ Kit phát hiện nhanh độc tố SEB sau khi được lắp ráp và đóng gói hoàn thiện được chúng tôi gửi sang Viện Kiểm nghiệm An toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia để tiến hành kiểm nghiệm độc lập sản phẩm que thử phát hiện nhanh độc tố SEB. Kết quả thử nghiệm cho thấy bộ test phát hiện nhanh độc tố SEB đạt yêu cầu kỹ thuật đưa ra với ngưỡng phát hiện là 12 ng/ml, độ nhạy cao 100%, ngoài ra độ đặc hiệu còn đạt 100% cao hơn yêu cầu là 97,5%, thời gian đọc kết quả nhanh trong vòng 5 phút. Viện Kiểm nghiệm An toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia đã cấp giấy chứng nhận kết quả kiểm nghiệm sản phẩm que thử nhanh độc tố SEB ngày 28 tháng 3 năm 2016.

KẾT LUẬN

Que thử phát hiện nhanh độc tố SEB đã được nghiên cứu chế tạo thành công với ngưỡng phát hiện là 10 ng/ml, độ nhạy là 100%, độ đặc hiệu là 96,66%; que thử phát hiện nhanh độc tố SEB không phản ứng chéo với các độc tố khác như SEA, SEC, SED và SEE nồng độ từ 0 - 100 ng/ml; thời gian đọc kết quả là 10 phút.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện từ nguồn kinh phí của Đề tài cấp nhà nước "Nghiên cứu chế tạo que thử phát hiện nhanh độc tố Staphylococcal enterotoxin B (SEB) của S. aureus" giai đoạn 2013 -

2015 do PGS. TS. Nguyễn Ngọc Minh, Viện Nghiên cứu hệ gen làm chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Balaban N, Rasooly A (2000) Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 61: 1-10.
- Celine M, Jacques G, Gilles L (1990) Rapid and sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Staphylococcal enterotoxin B in cheese. *Appl Environ Microbiol* 57(3): 836-842.
- Ching KH, He X, Stanker LH, Lin AV, McGarvey JA, Hnasko R (2015) Detection of shiga toxins by lateral flow assay. *Toxins* 7: 1163-1173.
- Connelly JT, Nugen SR, Borejsza-Wysocki W, Durst RA, Montagna RA, Baeumner AJ (2008) Human pathogenic *Cryptosporidium* species bioanalytical detection method with single oocyst detection capability. *Anal Bioanal Chem* 391: 487.
- Gao H, Han J, Yang S, Wang Z, Wang L, Fu Z (2014) Highly sensitive multianalyte immunochromatographic test strip for rapid chemiluminescent detection of ractopamine and salbutamol. *Anal Chim Acta* 839: 91-96.
- Gholamzad M, Khatami MR, Ghassemi S, Malekshahi ZV, Shoostari MB (2015) Detection of Staphylococcus enterotoxin B (SEB) using an immunochromatographic test strip. *Jundishapur J Microbiol* 8.
- Hagström AE, Garvey G, Paterson AS, Dhamane S, Adhikari M, Estes MK, Strych U, Kourntzi K, Atmar RL, Willson RC (2015) Sensitive detection of norovirus using phage nanoparticle reporters in lateral-flow assay. *PLoS one* 10: e0126571.
- Jones CL, Khan SA (1986) Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 166: 29-33.
- King KD, Anderson GP, Bullock KE, Regina MJ, Saaski EW, Ligler FS (1999) Detecting staphylococcal enterotoxin B using an automated fiber optic biosensor. *Biosens Bioelectron* 14(2): 163-170.
- Lin H, Tsai W (2003) Piezoelectric crystal immunosensor for the detection of staphylococcal enterotoxin B. *Biosens Bioelectron* 18: 1479-1483.
- Madhu PC, Joseph W, Greg EC (2007) Sandwich electrochemical immunoassay for the detection of Staphylococcal enterotoxin B based on immobilized thiolated antibodies. *Biosens Bioelectron* 22: 2932-2938.
- Mahmoud L, Martin H, Magdy A, Bo M (2009) A capacitive biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B. *Anal Bioanal Chem* 393: 1539-1544.

- Martin M, Fueyo J, González-Hevia M, Mendoza MC (2004) Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. *Int J Food Microbiol* 94: 279-286.
- Matsui S, Terabe M, Mabuchi A, Takahashi M, Saizawa M, Tanaka S, Yokomuro K (1997) A unique response to Staphylococcal enterotoxin B by intrahepatic lymphocytes and its relevance to the induction of tolerance in the liver. *Scand J Immunol* 1997(46): 230-234.
- Minghui Y, Yordan K, Hugh AB, Avraham R (2009) Gold nanoparticle-based enhanced chemiluminescence immunosensor for detection of Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) in food. *Int J Food Microbiol* 133(3): 265-71.
- Moon J, Kim G, Lee S (2012) A gold nanoparticle and aflatoxin B1-BSA conjugates based lateral flow assay method for the analysis of aflatoxin B1. *Materials* 5: 634-643.
- Nathalie K, Patricia La, Hervé B, Karine D, Christophe C, Hervé V (2008) Detection of Staphylococcus enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing. *Anal Bioanal Chem* 377: 182-188.
- Nghiêm Ngọc Minh, Nguyễn Thị Hoài Thu, Hậu Thị Thu Trang, Nguyễn Thái Sơn (2013) Biểu hiện, tinh sạch và kiểm tra độc tố của protein tái tổ hợp Staphylococcal enterotoxin B (SEB). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 11: 565-570.
- Nghiêm Ngọc Minh, Nguyễn Thị Hoài Thu, Phạm Thùy Linh, Thân Đức Dương, Lê Văn Phan (2016) Nghiên cứu tạo dòng tế bào lai sinh kháng thể đơn dòng kháng độc tố Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) có nguồn gốc từ *Staphylococcus aureus*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 14: 23-28.
- Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli L, Mioni R, Scuota S, Bolzoni G (2005) Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int J Food Microbiol* 98: 73-79.
- Rodríguez A, Gordillo R, Andrade M, Córdoba J, Rodríguez M (2016) Development of an efficient real-time PCR assay to quantify enterotoxin-producing Staphylococci in meat products. *Food Control* 2016(60): 302-308.
- Rong-Hwa S, Shiao-Shek T, Der-Jiang C, Yao-Wen H (2010) Gold nanoparticle-based lateral flow assay for detection of staphylococcal enterotoxin B. *Food Chem* 118: 462-466.
- Rosec J, Gigaud O (2002) Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int J Food Microbiol* 77: 61-70.
- Shylaja R, Murali H, Batra H, Bawa A (2010) A novel multiplex PCR system for the detection of Staphylococcal enterotoxin B, TSST, Nuc and Fem genes of *Staphylococcus aureus* in food system. *J Food Saf* 2010(30): 443-454.
- Terry CF, Harris N, Parkes HC (2002) Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. *JAOAC Int* 85: 768-774.
- Todd MK, Cynthia AR, Don M, Roger WP, Erik AH (2000) Rapid and sensitive immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of staphylococcal enterotoxin B. *J Immunol Methods* 236: 9-17.
- Trần Thị Sao Mai, Lê Quang Hòa, Nguyễn Thị Khánh Trâm (2015) Nghiên cứu phát triển hệ thống sắc ký miễn dịch cạnh tranh phát hiện nhanh các độc tố ruột tụ cầu trong sữa. *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology* 31.
- Tsui PY, Chiao DJ, Wey JJ, Liu CC, Yu CP, Shyu RH (2013) Development of Staphylococcal enterotoxin B detection strips and application of SEB detection strips in food. *J Med Sci* 33: 285-291.
- Ulrich RG, Sidell S, Taylor TJ (1997) Staphylococcal enterotoxin B and related pyrogenic toxins. *Medical aspects of chemical and biological warfare* 621-630.
- Wong RC, Harley YT (2009) Quantitative, false positive, and false negative issues for lateral flow immunoassays as exemplified by onsite drug screens. *Lateral flow immunoassay*: 1-19. Springer.

DEVELOPMENT OF RAPID DETECTION STRIP SEB TOXIN FROM STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN A LABORATORY SCALE

Nguyen Thi Hoai Thu¹, Le Trong Van², Nghiem Ngoc Minh¹

¹Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Chemistry-Biology and Professional Documents, Ministry of Public Security

SUMMARY

Staphylococcus aureus is one of the microorganisms factors cause food poisoning. *S. aureus* secreted more than 20 different types of superantigens. Among these, staphylococcal enterotoxin B (SEB) is a common agent of food poisoning. As a quick, and simple method that requires less technical training,

immuno-chromatography test (ICT) or lateral flow test strip (LFTS) has been widely used for diagnosis and rapid detection of SEB toxin. In addition, the LFTS has a long shelf-life and does not require refrigeration for its storage, so is suitable for use in developing countries, small ambulatory care facilities, remote regions and battlefield. In this study, SEB strip was successfully developed and tested in a laboratory scale. The test strip was capable of detecting SEB toxin at a concentration of 10 ng/ml. Its sensitivity and specificity were 100% and 96.66%, respectively. No cross-reactivity with other toxins including superantigen relatives such as SEA, SEC, SED and SEE was detected in this SEB test strip. The result was read after 10 minutes and the quality was equivalent to the imported test strips. Production of the immunochromatographic Strip for SEB detection from *S. aureus* plays an important role in food safety, prevention, and consumer protection.

Keywords: *Immuno-chromatography test, lateral flow test strip, S. aureus, SEB test strip, SEB*