

BỆNH VIỆN QUẢN Y 103**TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH SẢN XUẤT NHA BÀO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* VÀ ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ DIỆT NHA BÀO CỦA CHẤT KHỬ KHUẨN ĐANG DÙNG TẠI VIỆT NAM**

PGS.TS. Kiều Chí Thành,
ThS Lê Thị Thu Hương, TS Vũ Thu Hương

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**Đối tượng nghiên cứu**

- Quy trình sản xuất nha bào *C. difficile* dùng để đánh giá hiệu quả diệt nha bào của chất khử khuẩn
- Hóa chất khử khuẩn mức độ cao đang dùng tại Việt Nam: glutaraldehyde 2%, peracetic acid 0,15 %, javen 10%, chloramine B 0.5%.
- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 8/2015 đến tháng 6/2016.

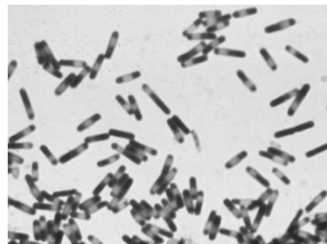
ĐẶT VẤN ĐỀ

- C. difficile* là trực khuẩn Gram dương, kỵ khí tuyệt đối, sinh nha bào và là một tác nhân nhiễm khuẩn bệnh viện quan trọng.
 - Sử dụng hóa chất để khử khuẩn môi trường và vật liệu lây nhiễm là một trong những biện pháp quan trọng, góp phần kiểm soát nhiễm khuẩn do *C. difficile* nói riêng.
- Tối ưu hóa quy trình sản xuất nha bào *C. difficile* tinh khiết và chất lượng cao.
 - Ứng dụng quy trình đánh giá hiệu quả diệt nha bào *C. difficile* của một số chất khử khuẩn mức độ cao đang dùng tại Việt Nam.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Danh sách chủng *C. difficile* nghiên cứu

ST T	Mã số chủng	Loại độc tố	Nguồn gốc
1	ATCC 700057	A-B-	Công ty Microbiologics, Minnesota, Mỹ
2	ATCC 43593	A-B-	Công ty Microbiologics, Minnesota, Mỹ
3	CDF 1098	A-B+	Bệnh viện Bạch Mai
4	CDF 1150	A-B+	Bệnh viện Bạch Mai
5	CDF 18	A+B+	Bệnh viện Bạch Mai
6	CDF 1005	A+B+	Bệnh viện Bạch Mai



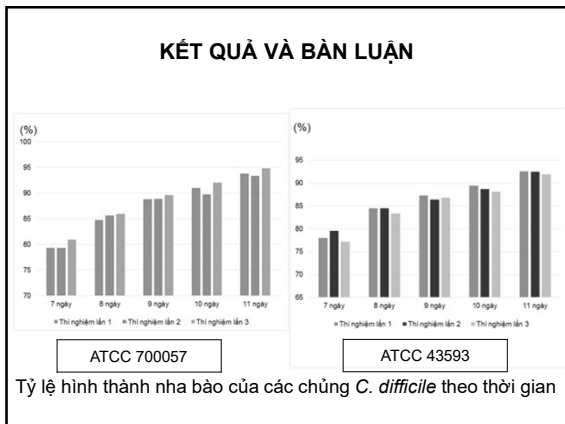
Hình thể *C. difficile*

*Nguồn: <http://www.medscape.com/viewarticle/850855>

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả lựa chọn môi trường khôi phục nha bào và lựa chọn chủng *C. difficile*

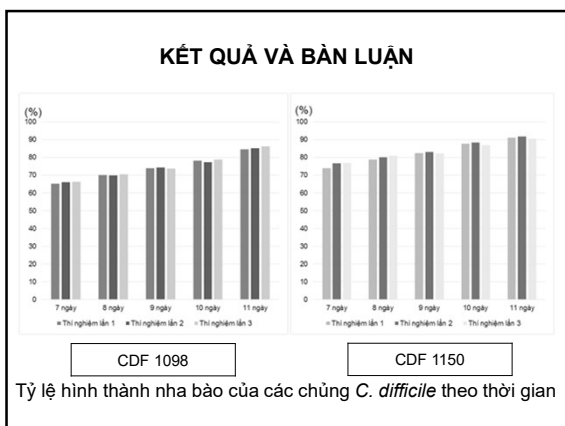
- Nha bào của cả 6 chủng *C. difficile* đều nảy mầm, phát triển và tạo khuẩn lạc tròn, hơi lồi, đường kính 3-4 mm, màu trắng xám trên môi trường GAM-HT.



KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả lựa chọn môi trường thạch tạo mầm nha bào *C. difficile*

Mã số chủng	Lần thử nghiệm	Thể tích nha bào	Nồng độ nha bào (CFU/ml)		
			GAM	GAM-H	GAM-HT
ATCC 700057	1	5ml	8.8×10^7	9.0×10^8	9.4×10^8
	2	5ml	8.9×10^7	8.9×10^8	9.0×10^8
	3	5ml	8.6×10^7	9.2×10^8	9.3×10^8
CDF 1150	1	5ml	4.3×10^7	6.3×10^8	6.5×10^8
	2	5ml	4.2×10^7	6.8×10^8	6.6×10^8
	3	5ml	4.5×10^7	6.5×10^8	6.8×10^8
CDF 18	1	5ml	7.5×10^7	7.9×10^8	8.0×10^8
	2	5ml	7.8×10^7	8.3×10^8	8.4×10^8
	3	5ml	7.6×10^7	8.2×10^8	8.5×10^8



KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

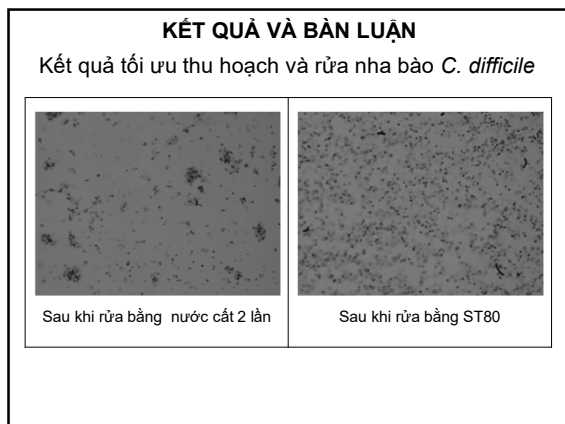
Kết quả xác định thời gian ủ tối ưu để thu hoạch nha bào *C. difficile*

Mã số chủng	Lần TN	Tỷ lệ hình thành nha bào (%)				
		7 ngày	8 ngày	9 ngày	10 ngày	11 ngày
ATCC 700057	1	78.95	81.71	85.01	89.74	93.09
	2	80.36	82.44	85.48	90.26	92.35
	3	79.64	81.31	84.27	88.83	90.67
CDF 1150	1	74.00	78.16	82.50	88.94	91.16
	2	75.60	79.31	83.06	87.23	90.33
	3	75.00	80.23	83.52	87.45	90.83
CDF 18	1	77.78	81.78	85.75	88.72	91.56
	2	78.75	82.53	86.94	90.12	92.04
	3	78.95	81.71	85.01	89.74	93.09

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả lựa chọn môi trường tăng sinh chủng *C. difficile*

Mã số chủng	Lần thử nghiệm	Thể tích nha bào	Nồng độ nha bào (CFU/ml)	
			CCMB	CMM
ATCC 700057	1	5ml	9.0×10^7	7.7×10^8
	2	5ml	8.7×10^7	8.0×10^8
	3	5ml	9.2×10^7	8.3×10^8
CDF 1150	1	5ml	3.1×10^7	3.3×10^8
	2	5ml	3.6×10^7	3.6×10^8
	3	5ml	3.3×10^7	3.5×10^8
CDF 18	1	5ml	5.7×10^7	5.5×10^8
	2	5ml	5.8×10^7	5.8×10^8
	3	5ml	6.0×10^7	5.6×10^8



KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả độ tinh khiết của nha bào

Mã số chủng	Lần thí nghiệm	Độ tinh khiết
ATCC 700057	1	95.2%
	2	96.1%
	3	95.5%
CDF 150	1	96.7%
	2	95.9%
	3	96.0%
CDF 18	1	96.6%
	2	95.4%
	3	96.2%

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬNKết quả khả năng diệt nha bào *C. difficile*
ATCC 700057 của javen 10 %

Điều kiện thí nghiệm	Lần thí nghiệm	Sự giảm số lượng nha bào ở các mốc thời gian tiếp xúc (lần)		
		1'	5'	60'
Sạch	1	3.1×10^5	3.1×10^5	3.1×10^5
	2	3.8×10^5	3.8×10^5	3.8×10^5
	3	3.6×10^5	3.6×10^5	3.6×10^5
Ô nhiễm	1	3.1×10^5	3.1×10^5	3.1×10^5
	2	3.8×10^5	3.8×10^5	3.8×10^5
	3	3.6×10^5	3.6×10^5	3.6×10^5

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬNKết quả khả năng diệt nha bào *C. difficile*
ATCC 700057 của steranos 2%

Điều kiện thí nghiệm	Lần thí nghiệm	Sự giảm số lượng nha bào ở các mốc thời gian tiếp xúc (lần)		
		1'	5'	60'
Sạch	1	2.1×10^0	1.0×10^1	3.1×10^5
	2	2.6×10^0	1.2×10^1	3.8×10^5
	3	2.4×10^0	1.1×10^1	3.6×10^5
Ô nhiễm	1	2.2×10^0	0.9×10^1	3.1×10^5
	2	2.3×10^0	1.2×10^1	3.8×10^5
	3	2.2×10^0	1.3×10^1	3.6×10^5

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬNKết quả khả năng diệt nha bào *C. difficile*
ATCC 700057 của chloramin B 0.5%

Điều kiện thí nghiệm	Lần thí nghiệm	Sự giảm số lượng nha bào ở các mốc thời gian tiếp xúc (lần)		
		1'	5'	60'
Sạch	1	3.1×10^5	3.1×10^5	3.1×10^5
	2	3.8×10^5	3.8×10^5	3.8×10^5
	3	3.6×10^5	3.6×10^5	3.6×10^5
Ô nhiễm	1	3.1×10^5	3.1×10^5	3.1×10^5
	2	3.8×10^5	3.8×10^5	3.8×10^5
	3	3.6×10^5	3.6×10^5	3.6×10^5

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬNKết quả khả năng diệt nha bào vi khuẩn *C. difficile* ATCC
700057 của anioxyde 0.15%

Điều kiện thí nghiệm	Lần thí nghiệm	Sự giảm số lượng nha bào ở các mốc thời gian tiếp xúc (lần)		
		1'	5'	60'
Sạch	1	1.8×10^4	3.1×10^5	3.1×10^5
	2	2.2×10^4	3.8×10^5	3.8×10^5
	3	2.1×10^4	3.6×10^5	3.6×10^5
Ô nhiễm	1	3.1×10^4	3.1×10^5	3.1×10^5
	2	1.9×10^4	3.8×10^5	3.8×10^5
	3	1.8×10^4	3.6×10^5	3.6×10^5

KẾT LUẬN

- Hoàn thiện tối ưu quy trình sản xuất nha bào:
 - Chủng sản xuất: A-B-: ATCC 700057, A-B+: CDF 1150, A+B+: CDF 18.
 - Môi trường khô phục nha bào: GAM-HT.
 - Môi trường tăng sinh chủng: CMM.
 - Môi trường thạch tạo mầm nha bào: GAM-H.
 - Thời gian ủ tối ưu để thu hoạch nha bào: 11 ngày
 - Hóa chất rửa nha bào: ST80
 - Tinh khiết nha bào: quy trình tinh khiết của Lawley (2009) có cải tiến.

KẾT LUẬN

2. Kết quả đánh giá khả năng diệt nha bào *C. difficile* của 4 hóa chất khử khuẩn mức độ cao:

- 3 chất là anioxyde 0,15 %, javen 10% và chloramin B 0.5% đáp ứng tiêu chí giảm $\geq 10^5$ lần số lượng nha bào *C. difficile* khi tiếp xúc 5 phút cả ở điều kiện sạch và điều kiện ô nhiễm.
- Steranios 2% (glutaraldehyde 2%) không giảm được 10^5 lần số lượng nha bào *C. difficile* khi tiếp xúc 5 phút.

KIẾN NGHỊ

1. Quy trình sản xuất nha bào có thể áp dụng đối với sản xuất các nha bào khác như nghiên cứu sản xuất nha bào cho probiotics.
2. Hiệu quả diệt nha bào *C. difficile* nên được đưa vào quy trình khảo nghiệm hóa chất của Bộ Y tế.

