

DETECTION OF METHICILLIN RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* USING LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION

Tran Hong Diem¹, Nguyen Thi Truc Anh², Nguyen Hong Phuc¹, Vu Quang Hieu^{3*}

¹NTT Hitech Institute, Nguyen Tat Thanh University - 298-300A Nguyen Tat Thanh, Dist 4, Ho Chi Minh City, Vietnam

²University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City - 217 Hong Bang, Ward 11, Dist 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Department of Biotechnology, NTT Hitech Institute, Nguyen Tat Thanh University - 298-300A Nguyen Tat Thanh, Dist 4, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received: 23/12/2024

Revised: 10/01/2025; Accepted: 21/01/2025

ABSTRACT

Objective: To develop a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detecting Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using the characteristic *mecA* gene, aimed at rapid MRSA detection in nasal swab samples.

Methods: An experimental study was conducted on 60 nasal swab samples from healthy individuals aged 18-25. Specific primers for the LAMP reaction were designed using primer design software. The LAMP reaction conditions were optimized in the laboratory to determine the temperature, specificity, and minimum DNA detection limit (LOD). The optimized LAMP reaction was then tested on 60 DNA extraction samples from nasal swabs, including 30 MRSA-positive and 30 MRSA-negative samples.

Results: Specific primers for *mecA* gene were successfully designed, and the amplification reaction was optimized at 65°C for 30 minutes. The LAMP method demonstrated high sensitivity and specificity, with the lowest detection limit (LOD) of 1 pg of DNA extracted from MRSA per reaction, and no cross-reactivity with other species was observed. When applied to 60 DNA samples extracted from nasal swabs (30 MRSA-positive and 30 MRSA-negative), the LAMP reaction achieved 100% sensitivity, 100% specificity, and a Kappa coefficient of 1, indicating a high degree of agreement compared to traditional microbiological culture and PCR methods.

Conclusions: The study successfully applied the LAMP method to detect the presence of MRSA in clinical samples with high sensitivity and specificity using the *mecA* gene. Furthermore, the study demonstrated a high level of agreement between the LAMP method, microbiological culture, and PCR diagnostics. LAMP is a promising method for MRSA detection, serving as a rapid diagnostic tool with high applicability to support effective treatment.

Keywords: LAMP, MRSA, nasal swab, isothermal amplification, *mecA* gene.

*Corresponding author

Email: vqhieu@ntt.edu.vn Phone: (+84) 869974364 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD1.1989>

PHÁT TRIỂN PHƯƠNG PHÁP KHUẾCH ĐẠI TRUNG GIAN VÒNG LẶP CHO PHÁT HIỆN VI KHUẨN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* KHÁNG METHICILLIN

Trần Hồng Diễm¹, Nguyễn Thị Trúc Anh², Nguyễn Hồng Phúc¹, Vũ Quang Hiếu^{3*}

¹Viện Kỹ thuật công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành - 298-300A Nguyễn Tất Thành, Q. 4, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh - 217 Hồng Bàng, P. 11, Q. 5, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Khoa Công nghệ sinh học, Viện Kỹ thuật công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành - 298-300A Nguyễn Tất Thành, Q. 4, Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài: 23/12/2024

Chỉnh sửa ngày: 10/01/2025; Ngày duyệt đăng: 21/01/2025

TÓM TẮT

Mục tiêu: Phát triển phương pháp khuếch đại trung gian vòng lặp (LAMP) trong phát hiện vi khuẩn *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin bằng gene *mecA* đặc trưng ứng dụng trong phát hiện nhanh MRSA trên mẫu phết mũi.

Phương pháp: Nghiên cứu thực nghiệm được tiến hành 60 mẫu phết mũi ở nhóm người khỏe mạnh có độ tuổi từ 18-25. Thực hiện thiết kế bộ mồi đặc hiệu cho phản ứng LAMP trên phần mềm thiết kế mồi. Phản ứng LAMP được tối ưu hóa điều kiện phản ứng trong phòng thí nghiệm nhằm xác định nhiệt độ, độ đặc hiệu và giới hạn phát hiện tối thiểu của DNA (LOD). Phản ứng LAMP sau tối ưu được thử nghiệm trên 60 mẫu ly trích DNA từ mẫu phết mũi, trong đó có 30 mẫu dương tính với MRSA và 30 mẫu âm tính với MRSA.

Kết quả: Các cặp mồi đặc hiệu cho gene *mecA* đã được thiết kế và phản ứng khuếch đại được tối ưu hóa ở 65°C trong 30 phút. Phương pháp LAMP cho kết quả nhạy, đặc hiệu cao với giới hạn phát hiện thấp nhất (LOD) là 1 pg DNA tách chiết từ MRSA có trong mỗi phản ứng và không xảy ra phản ứng chéo loài. Khi ứng dụng phương pháp LAMP trên 60 mẫu DNA tách chiết từ mẫu phết mũi, phản ứng LAMP đã cho độ nhạy, độ đặc hiệu đạt 100% và hệ số Kappa bằng 1 đạt mức tương đồng cao khi so sánh với phương pháp nuôi cấy vi sinh và PCR truyền thống.

Kết luận: Nghiên cứu đã ứng dụng phương pháp LAMP trong phát hiện sự hiện diện của vi khuẩn MRSA từ các mẫu lâm sàng, với độ đặc hiệu, độ nhạy cao bằng gene *mecA*. Đồng thời, nghiên cứu cũng cho thấy mức độ tương đồng cao giữa phương pháp LAMP và phương pháp chẩn đoán nuôi cấy vi sinh và PCR. LAMP là một phương pháp đầy tiềm năng để phát hiện MRSA, là công cụ chẩn đoán nhanh có tính ứng dụng cao, hỗ trợ điều trị hiệu quả.

Từ khóa: LAMP, MRSA, mẫu phết mũi, khuếch đại đẳng nhiệt, gene *mecA*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Staphylococcus aureus, một tác nhân gây nhiễm trùng ở người và ngày càng trở thành mối lo ngại trong y học cũng như ngành chăn nuôi động vật, đang tạo ra mối đe dọa trên toàn thế giới [1]. Trong y tế, *S. aureus* có khả năng lây lan trong bệnh viện, lây nhiễm chéo giữa các bệnh nhân gây khó khăn trong quản lý dịch tễ và điều trị [2-3]. Vì những mối nguy mà *S. aureus* có thể gây ra cho bệnh nhân mà chúng đã được xem là mục tiêu xét nghiệm được phê chuẩn trong hầu hết các hệ thống an toàn thực phẩm và y tế trên thế giới [4-6].

Tiêu chuẩn vàng trong phát hiện *S. aureus* là nuôi cấy

vi sinh, tùy vào mẫu bệnh phẩm, mà quá trình phân lập và thử nghiệm kháng sinh thường mất từ 4-7 ngày [7]. Các phương pháp miễn dịch học như kết tủa miễn dịch, xét nghiệm ELISA và phương pháp Western blot cũng được sử dụng để nhận diện *S. aureus* thông qua liên kết đặc hiệu kháng nguyên - kháng thể [8]. Do *S. aureus* là vi khuẩn thường trú, gây bệnh cơ hội trên người và hậu quả gây bệnh có thể rất nghiêm trọng, vì vậy phát triển phương pháp phát hiện nhanh *S. aureus* với chi phí thấp trở nên cần thiết [1, 9, 10], trong đó phản ứng chuỗi polymerase (PCR) gần đây đã trở nên phổ biến trong việc phát hiện axit nucleic của

*Tác giả liên hệ

Email: vqhieus@ntt.edu.vn Điện thoại: (+84) 869974364 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD1.1989>

S. aureus [11-14]. Để phát hiện *S. aureus* bằng PCR, nhiều gene mục tiêu đã được nghiên cứu, bao gồm nuc, spa, blaZ, và mecA. Trong số đó, gene mecA, mã hóa protein penicillin binding 2A đột biến, có khả năng ngăn chặn sự bám của kháng sinh họ beta lactam trong quá trình tổng hợp thành tế bào vi khuẩn [15].

PCR yêu cầu một chu trình nhiệt chính xác và thời gian chạy dài, từ đó giới hạn việc áp dụng quy trình tiêu chuẩn cho PCR chẩn đoán tại điểm chăm sóc (point of care POC), thực địa. Do vậy hiện nay, các phương pháp khuếch đại gene mục tiêu đẳng nhiệt được tập trung phát triển để phát hiện mầm bệnh tại POC do thuận lợi là không đòi hỏi sự đầu tư nhiều về cơ sở vật chất. Những phương pháp khuếch đại gene mục tiêu đẳng nhiệt có thể kể đến bao gồm: khuếch đại đẳng nhiệt qua vòng lặp (LAMP) [16], khuếch đại mỗi chéo (CPA) [17], phản ứng xoắn polymerase (PSR) [18], và khuếch đại polymerase tái tổ hợp (RPA) [19]. Tất cả các phương pháp này đã chứng minh độ nhạy và độ đặc hiệu tốt (LOD) ở giới hạn phát hiện tối ưu. Hơn nữa, so với PCR truyền thống, các xét nghiệm này đơn giản hơn, nhanh hơn và ít tốn kém hơn. Ví dụ, LAMP được nghiên cứu phát triển và ứng dụng chẩn đoán nhiều mầm bệnh khác nhau, bao gồm chẩn đoán sự hiện diện của virut gây dịch tả lợn châu Phi [20], phát hiện *Salmonella typhi* có trong thực phẩm [21], chẩn đoán vi khuẩn gây viêm phổi *Haemophilus influenza* [22], phát hiện gene vanA kháng Vancomycin [23].

Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tập trung phát triển khả năng ứng dụng phương pháp LAMP trong phát hiện sự hiện diện của vi khuẩn MRSA có trong các mẫu phết lâm sàng.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế môi

Đoạn gene mecA sử dụng trong thiết kế môi LAMP được lấy từ NCBI. Đoạn môi làm được thiết kế theo trang web <https://primerexplorer.jp/e/>. Các đoạn môi sau thiết kế được kiểm tra độ đặc hiệu in silico trên NCBI primer blast. Trình tự đoạn môi sau thiết kế được liệt kê theo bảng 1.

Bảng 1. Trình tự môi trong được thiết kế trong nghiên cứu

Tên	Trình tự 5'-3'	Gene	Vi khuẩn
F3	CATTGATCGCAAC-GTTCAA	mecA	<i>S. aureus</i> kháng Methicilin
B3	TTCTTTGGAACGATG-CCT		
FIP	TGCATTCCTGGAATA-ATGACGC-GTTA-AAGAAGATGGTATGT-GGAAG		
BIP	CAGAACGTGGTA-AAATTTAGAC-CG-ATCTCATATGCT-GTTCCTGTA		
LoopF	ATGATCCCAATCTAA		
LoopR	AAACAATGTGGAATTG		

2.2. Các dòng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu

S. aureus ATCC 233592, *S. aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*. Các vi khuẩn trên được nuôi cấy trong môi trường Tryptone Soya Broth (TSB) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, India) ở 37°C, tốc độ lắc 100 vòng/phút trong 16 giờ.

2.3. Tách chiết DNA

Việc tách chiết DNA của vi khuẩn được thực hiện theo phương pháp CTAB, Phenol Chloroform, Isoamyl alcohol (Sigma Aldrich). Cụ thể, 1 mL tế bào *S. aureus* nuôi cấy qua đêm được ly tâm, sau đó thu nhận phần cặn tế bào. Tủa tế bào được hòa tan lại trong 800 µL dung dịch đệm ly giải CTAB 2% (đã làm nóng trước ở 65°C) và ủ ở 65°C trong 60 phút. Sau đó, các mẫu được ly tâm ở 14.000 g tại 4°C trong 15 phút. Phần dịch nổi được chuyển sang các ống mới và trộn với một lượng bằng nhau hỗn hợp Phenol:Isoamyl alcohol:Chloroform (PCI v/v 25:24:1). Hỗn hợp này sau đó được ly tâm ở 14.000 g trong 15 phút tại 4°C để tách pha. Lớp trên cùng được cẩn thận chuyển sang ống mới và trộn với 2,5 lần thể tích cồn tuyệt đối. Các ống sau đó được ủ qua đêm ở -20°C để kết tủa DNA. Sau đó, các ống này được ly tâm để thu nhận phần cặn DNA. DNA được hòa tan lại trong 50 µL nước siêu sạch (ddH₂O). Độ tinh khiết và nồng độ DNA được đo bằng phổ UV-vis ở bước sóng 260/280 nm bằng thiết bị Genova Plus Spectrophotometer (Jenway, Staffordshire, Liên hiệp Anh). DNA đã thu được được lưu trữ ở -20°C cho đến khi sử dụng.

2.4. Phản ứng PCR khuếch đại gene mục tiêu

Phản ứng PCR để kiểm tra độ đặc hiệu của môi được thực hiện với thể tích 20 µL với nồng độ môi LAMP F3, B3 là 0,4 µM, và 4 µL dung dịch đệm 5X Mytaq, 0,2 µL enzyme MyTaq DNA polymerase (Bioline, Luân Đôn, Liên hiệp Anh) và 1 µL mẫu DNA. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR bao gồm nhiệt độ tiền biến tính 95°C trong 2 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ nhiệt với nhiệt độ biến tính 95°C trong 30 giây, bắt môi 55°C trong 30 giây, kéo dài 68°C cho 30 giây. Phản ứng kéo dài cuối cùng 68°C trong 10 phút, và trữ ở nhiệt độ 4°C. Sản phẩm được điện di trên gel agarose 1,5%.

2.5. The standard LAMP reaction

Phản ứng LAMP được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Cat. no. M0482L-NEB, Anh Quốc). Trong phản ứng 15 µL sẽ chứa 2 µM môi F3, B3, 1,6 µM môi FIP, BIP, 0,4 µM môi LoopF, LoopR, 5 µL sample, 7,5 µL WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA), 1 µL mẫu DNA và nước khử ion. Sau đó phản ứng được trộn đều và ủ trong 60 phút ở 65°C.

2.6. Đánh giá độ đặc hiệu và giới hạn phát hiện của phản ứng LAMP

DNA của các vi khuẩn sau ly trích được sử dụng để

kiểm tra độ đặc hiệu bằng cách kiểm tra các phản ứng chéo loài. Phản ứng kiểm tra chéo loài được thực hiện với nồng độ phản ứng LAMP ở trên với nồng độ DNA cho phản ứng là 1 ng/μL DNA/phản ứng.

Giới hạn phát hiện của phản ứng LAMP được xác định bằng nồng độ thấp nhất mà lượng DNA ly trích của vi khuẩn MRSA có thể phát hiện dương tính. Nồng độ DNA của mẫu được pha loãng ở các nồng độ khác nhau 10-6-102 ng. Độ nhạy của phản ứng là độ pha loãng DNA cuối cùng mà phản ứng phát hiện MRSA là dương tính. Các phản ứng được thực hiện với 3 lần lặp lại.

2.7. Đạo đức nghiên cứu

Y đức của nghiên cứu được được chuẩn y bởi Hội đồng Y đức Trường Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh (Quyết định số 30/HDD-ĐHYD) từ 1/2024 đến 9/2024.

2.8. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu phết mũi của các tình nguyện viên có độ tuổi từ 18-25. Các tình nguyện viên khi cho mẫu trong trạng thái sức khỏe tốt, không bệnh, không sốt ho, không viêm mũi, không sử dụng kháng sinh trong ít nhất 2 tuần đến khi cho mẫu.

- *Tiêu chí lựa chọn mẫu*: tình nguyện viên tham gia cho mẫu nghiên cứu là người khỏe mạnh, không có các triệu chứng bệnh lâm sàng cũng như không sử dụng thuốc kháng sinh trong 2 tuần trước ngày cho mẫu.

Cách lấy mẫu: mẫu phết được lấy cách đầu mũi khoảng 1,5-2 cm. Tăm bông sau đó được cọ sát vào thành mũi và xoay 5 vòng. Cùng tăm bông, thực hiện việc lấy mẫu phết với cánh mũi còn lại. Mẫu phết sau đó được trữ trong 5 mL nước muối sinh lý. Sau đó, 200 μL mẫu được lấy để thực hiện phân lập nuôi cấy vi sinh. Phần còn lại được sử dụng để ly trích DNA theo phương pháp CTAB, Phenol Chloroform, Isoamyl alcohol (Sigma Aldrich, Singapore) đã nêu ở trên.

- *Tiêu chuẩn loại trừ*: mẫu phết mũi từ các tình nguyện viên có các triệu chứng viêm tai mũi họng, đã và đang sử dụng thuốc kháng sinh. Tình nguyện viên đờ ỉ, không tham gia nghiên cứu. Mẫu phết lưu trữ và phân lập sai cách.

2.9. Cỡ mẫu nghiên cứu

Tổng số mẫu phết được chọn sau khi phân lập MRSA và PCR là 60 mẫu, trong đó có 30 mẫu phát hiện dương tính với MRSA và *mecA*, còn lại 30 mẫu âm tính với kết quả MRSA và *mecA*.

2.10. Đánh giá khả năng phát hiện vi khuẩn MRSA từ mẫu phết mũi

Để đánh giá khả năng phát hiện MRSA bằng phương pháp LAMP, 30 mẫu DNA có có kết quả nuôi cấy và thử nghiệm kháng sinh đồ với Cefoxitin theo tiêu chuẩn CLSI là MRSA cũng như có kết quả khuếch đại gene *mecA* bằng PCR; và 30 mẫu DNA có kết quả nuôi cấy không kháng với Cefoxitin và kết quả PCR gene *mecA*

là âm tính được chọn để thực hiện phản ứng LAMP. Khi thực hiện các phản ứng LAMP, ký hiệu mẫu được che bởi kỹ thuật viên khác, nhằm bảo đảm tính ngẫu nhiên trong đánh giá khả năng khuếch đại đoạn gene *mecA* của phản ứng.

2.11. Thống kê

Độ nhạy, độ đặc hiệu và hệ số Kappa của phản ứng LAMP được tính toán theo mô tả của bảng dưới.

Phản ứng LAMP	Nuôi cấy, phân lập MRSA và PCR gene <i>mecA</i>		Tổng
	Dương tính	Âm tính	
Dương tính	a	b	a + b
Âm tính	c	d	c + d
Tổng	a + c	b + d	a + b + c + d (n)

$$\text{Độ nhạy} = \frac{a}{a + c}$$

$$\text{Độ đặc hiệu} = \frac{d}{b + d}$$

$$\text{Độ chính xác} = \frac{a + d}{n}$$

Mối quan hệ giữa phản ứng LAMP, phương pháp nuôi cấy, phân lập vi sinh và phương pháp PCR được đánh giá theo hệ số Kappa:

$$\text{Kappa} = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

trong đó P_o là tỷ lệ giữa 2 thử nghiệm cho kết quả giống nhau, P_e tỷ lệ dự đoán là kết quả của $P_e (+)$ và $P_e (-)$.

$$= (a + b)/n \times (a + c)/n; P_e (-) = (c + d)/n \times (b + d)/n$$

$$P_e (+) = \frac{a + b}{n} \times \frac{a + c}{n}$$

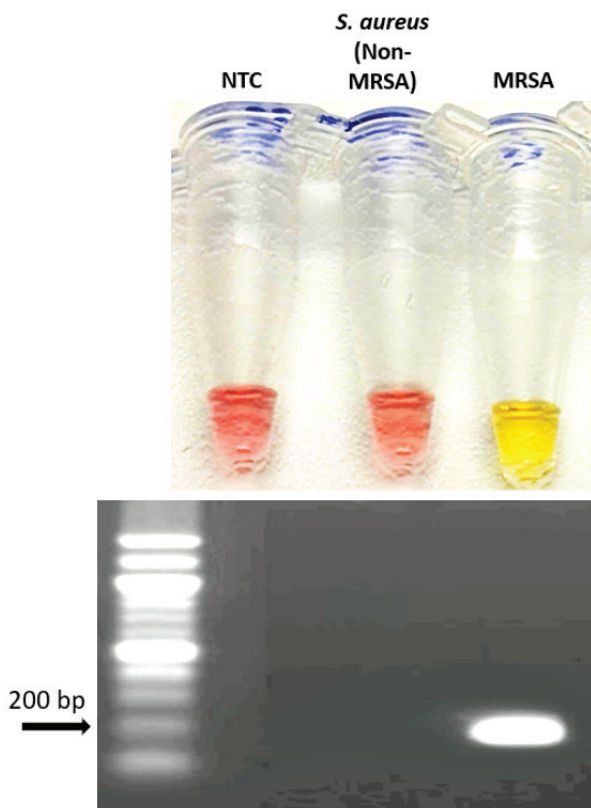
$$P_e (-) = \frac{c + d}{n} \times \frac{b + d}{n}$$

Hệ số Kappa được đánh giá như sau: 0-0,2 là tương đồng kém; 0,2-0,4 là tương đồng thấp; 0,4-0,6 là tương đồng trung bình; 0,6-0,8 là tương đồng khá; 0,8-1,0 là tương đồng cao.

3. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả LAMP và kiểm tra môi phát hiện MRSA

Phản ứng LAMP được phát triển để phát hiện sự hiện diện của MRSA trong qua việc phát hiện gene *mecA*, gene đại diện cho việc kháng lại kháng sinh Methicillin. Việc khuếch đại đặc trưng của bộ môi thiết kế được đánh giá bằng phản ứng LAMP và PCR với chủng MRSA ATCC33592, chủng *S. aureus* nhạy Methicillin ATCC 29213. Kết quả sau phản ứng LAMP tại nhiệt độ 65°C/50 phút cho thấy, màu của phản ứng chỉ thay đổi từ hồng đỏ sang vàng trong ống có sự hiện diện của MRSA ATCC33592, ngược lại ống chứa nước đối chứng âm (NTC) và *S. aureus* ATCC 29213 lại giữ nguyên không đổi màu. Đồng thời, khi kiểm tra độ đặc hiệu của môi được thiết kế bằng phương pháp PCR truyền thống, kết quả điện di trên gel cho thấy bộ môi thiết kế chỉ đặc trưng cho việc khuếch đại gene *mecA* của MRSA ATCC33592 được thiết kế (vị trí 200 bp), ngược lại không thấy sự khuếch đại DNA trên *S. aureus* ATCC 29213.



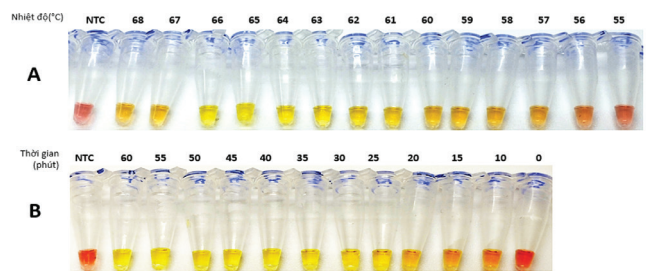
Hình 1. Kết quả thử nghiệm kiểm tra môi thiết kế bằng phản ứng LAMP (trên) và điện di sản phẩm PCR (dưới) với MRSA. NTC: negative control, đối chứng âm (nước cất), *S. aureus* non MRSA, ATCC29213 và MRSA ATCC33592

3.2. Nhiệt độ và thời gian phản ứng

Nhiệt độ phản ứng tối ưu của bộ môi thiết kế được kiểm tra nhằm tối ưu hóa nhiệt độ phản ứng. Các phản ứng LAMP trong thí nghiệm được thực hiện kiểm tra trong

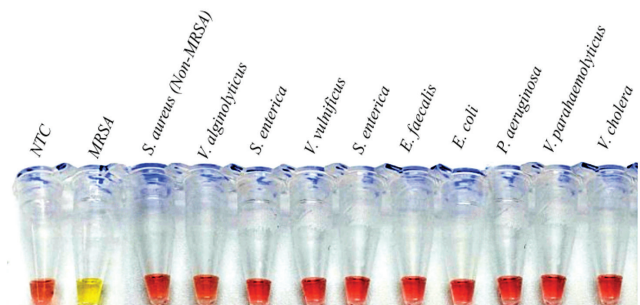
dãy nhiệt độ đề xuất của nhà sản xuất từ 55°C đến 68°C. Kết quả (hình 2A) cho thấy phản ứng LAMP đều cho kết quả dương tính ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau, từ 55°C đến 68°C, tuy nhiên màu sắc của phản ứng ở các nhiệt độ này lại khác nhau, chuyển từ đỏ cam sang vàng sáng. Tại vị trí nhiệt độ 64°C, 65°C và 66°C thì nhiệt độ của phản ứng sáng và rõ ràng nhất, không có sự khác biệt giữa chúng. Do vậy, nhiệt độ 65°C được sử dụng cho các phản ứng LAMP tiếp theo trong thí nghiệm.

Thời gian của phản ứng LAMP được xác định là thời gian đủ để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Trong thí nghiệm này, phản ứng LAMP với bộ môi thiết kế được theo dõi từ 10-60 phút, với khoảng cách quan sát là 5 phút. Trong kết quả (hình 2B), sau 10 phút phản ứng đã xảy ra, có sự chuyển biến màu sắc pH của phản ứng. Đến phút thứ 30 thì phản ứng gần như không thay đổi màu pH nữa, hoặc chỉ thay đổi không đáng kể. Do đó, có thể dừng phản ứng ở phút thứ 30.



Hình 2. A: Thử nghiệm xác định nhiệt độ tối ưu của phản ứng LAMP, đơn vị °C; **B:** Thử nghiệm xác định thời gian tối ưu để thử phản ứng, đơn vị phút. NTC đối chứng âm. Các phản ứng được lặp lại 3 lần.

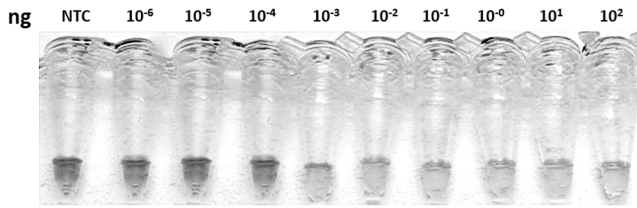
Khi thử nghiệm phản ứng LAMP với DNA của các vi khuẩn khác (hình 3) trong thử nghiệm độ đặc hiệu, ngoài DNA vi khuẩn MRSA ATCC33592, thì phản ứng LAMP âm tính đối với các loại vi khuẩn còn lại. Do đó, có thể kết luận được bộ môi LAMP được thiết kế có khả năng khuếch đại đặc hiệu gene *mecA* của MRSA.



Hình 3. Phản ứng LAMP chéo loài kiểm tra độ đặc hiệu của bộ môi thiết kế. NTC đối chứng âm, các phản ứng được lặp lại 3 lần

Giới hạn phát hiện (LOD) là mức DNA thấp nhất có trong mẫu mà phản ứng LAMP có thể khuếch đại. Khi thử nghiệm phản ứng LAMP với các nồng độ DNA MRSA ATCC33592 có trong mẫu khác nhau từ 10-6 đến 102 ng. Kết quả (hình 4) cho thấy tại nồng độ DNA

10⁻³ ng thì phản ứng dương tính. Do đó, có thể kết luận nồng độ DNA tối thiểu để phát hiện MRSA là 10⁻³ ng (hay 1 pg).



Hình 4. Giới hạn phát hiện của phản ứng LAMP đối với vi khuẩn MRSA có trong mẫu ly trích DNA. NTC đối chứng âm, phản ứng được thực hiện lặp lại 3 lần

3.3. Kết quả LAMP thực hiện trên các mẫu phết lâm sàng

Mẫu phết mũi sau sàng lọc được lấy về, một phần được đem về nuôi cấy phân lập *S. aureus* và thực hiện kháng sinh đồ với Cefoxitin theo phương pháp khuếch tán đĩa thạch tiêu chuẩn CLSI. Phần còn lại được tách chiết DNA phục vụ các phản ứng khuếch đại gene *mecA* bằng phương pháp PCR và LAMP. Khi thực hiện phản ứng LAMP trên 60 mẫu ly trích DNA, kết quả (bảng 2) cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu trong phản ứng trên các mẫu phết lâm sàng là 100% khi so sánh với kết quả PCR gene *mecA* và kết quả nuôi cấy, thử nghiệm kháng sinh của các vi khuẩn từ mẫu phết với độ nhạy 100%, độ đặc hiệu 100% và hệ số Kappa bằng 1 đạt mức độ tương đồng cao.

Bảng 2. Mối tương quan kết quả giữa phản ứng LAMP và nuôi cấy vi sinh, PCR kiểm tra MRSA

Kết quả nuôi cấy vi sinh/ Cefoxitin/PCR gene <i>mecA</i>	Phản ứng LAMP		Tổng
	Dương tính	Âm tính	
Dương tính	30	0	30
Âm tính	0	30	30
Tổng	30	30	60
Độ nhạy: 100% Độ đặc hiệu: 100% Chỉ số Kappa: 1			

4. BÀN LUẬN

S. aureus là vi khuẩn phổ biến gây ra nhiễm trùng hoặc thậm chí dẫn đến tử vong, đặc biệt là vi khuẩn *S. aureus* kháng Methicilin (MRSA), khi chúng có khả năng kháng lại các kháng sinh họ beta lactam, gây khó khăn cho điều trị nhiễm khuẩn bằng kháng sinh

[24, 25]. Để nhanh chóng ngăn chặn và phòng ngừa các hậu quả nghiêm trọng của việc nhiễm MRSA, việc phát triển phương pháp chẩn đoán sự hiện diện của chúng một cách nhanh chóng và hiệu quả là rất cần thiết. Hiện nay, LAMP là một kỹ thuật khuếch đại DNA mục tiêu ở điều kiện đẳng nhiệt đã và đang được sử dụng để phát hiện chính xác và nhanh chóng nhiều vi sinh vật gây bệnh [26]. Nhằm áp dụng phương pháp LAMP vào chẩn đoán sự hiện diện của MRSA, do đó nghiên cứu tập trung vào ứng dụng phương pháp này trong việc phát hiện sự hiện diện của MRSA thông qua việc khuếch đại gene *mecA*, trên mẫu phết mũi sau ly trích DNA. Hiệu quả khuếch đại của phản ứng LAMP phụ thuộc vào trình tự mục tiêu, nhiệt độ, nồng độ môi, cũng như chất lượng và loại mẫu được phân tích. Qua nghiên cứu, chúng tôi đã xác định các điều kiện tối ưu để khuếch đại gene *mecA* liên quan đến MRSA, có thể thực hiện trong bể ủ nhiệt. Thử nghiệm này khuếch đại hiệu quả trình tự mục tiêu trong 30 phút ở nhiệt độ 65°C. Các điều kiện này phù hợp với khoảng điều kiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khi so sánh với các nghiên cứu khác trên thế giới, điều kiện phản ứng bộ môi thiết kế của chúng tôi khá tương đồng với các nghiên cứu trước đó [27, 28].

Những ưu điểm của chẩn đoán sử dụng LAMP cho việc phát hiện MRSA bao gồm hiệu quả về thời gian và chi phí, đặc biệt phù hợp trong các điều kiện tại địa phương hạn chế về cơ sở vật chất. Trong nghiên cứu, phương pháp LAMP đã cho thấy độ đặc hiệu và độ nhạy cao. Không có hiện tượng phản ứng chéo loài nào được phát hiện với các vi sinh vật đã thử nghiệm khi kiểm bộ môi bằng cả hai phương pháp LAMP và PCR. Hơn nữa, phương pháp này thể hiện độ nhạy vượt trội, có khả năng phát hiện MRSA ở nồng độ tối thiểu, với giới hạn phát hiện (LOD) là 1 pg DNA trong thử nghiệm.

Khi thực hiện phản ứng LAMP với 60 mẫu DNA tách chiết từ mẫu phết mũi, được sắp xếp ngẫu nhiên. Các phản ứng của chúng tôi đã xác định thành công sự hiện diện của MRSA trong 30/60 tổng số mẫu phết mũi, được xác nhận bởi nuôi cấy vi sinh *S. aureus*, và kháng sinh đồ với Cefoxitin, và PCR gene *mecA*. Khi tính toán kết quả về độ nhạy, độ đặc hiệu trên các mẫu lâm sàng, thì độ nhạy và độ chính xác đạt 100%, và chỉ số Kappa tổng thể là 1. Kết quả của nghiên cứu là tương đương với báo cáo của Emara và cộng sự (2023) [28] và cao hơn so với nghiên cứu của Abusheraida và cộng sự 2024 [27] trong thực hiện phản ứng LAMP phát hiện gene *mecA* kháng kháng sinh. Mặc dù kết quả LAMP của chúng tôi trên mẫu phết mũi chỉ được thực hiện cỡ mẫu nhỏ (60 mẫu), tuy nhiên kết quả thử nghiệm ban đầu cho thấy LAMP có khả năng ứng dụng trong phát hiện MRSA, phù hợp cho mục tiêu chẩn đoán nhanh vi khuẩn. Trong tương lai, chúng tôi cần mở rộng số lượng thử nghiệm trên các mẫu phết mũi để đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu. Ngoài ra, thực hiện LAMP trên các nguồn khác như mẫu phết từ bề mặt thiết bị y tế, mẫu máu và ô apex sẽ được thực hiện để xác nhận tính khả thi của phương pháp này trong phát hiện MRSA.

5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu, chúng tôi đã ứng dụng thành công việc sử dụng phương pháp LAMP trong phát hiện sự hiện diện của vi khuẩn MRSA từ các mẫu lâm sàng với độ đặc hiệu, độ nhạy cao. Quan trọng hơn, nghiên cứu cũng cho thấy mức độ tương đồng cao giữa phương pháp LAMP và phương pháp chẩn đoán vi sinh truyền thống và PCR.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Tong S.Y.C, Davis J.S, Eichenberger E et al, Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management, Clin Microbiol Rev, 28, Epub ahead of print 2015, doi: 10.1128/CMR.00134-14.
- [2] Adams C.E, Dancer S.J, Dynamic transmission of Staphylococcus aureus in the intensive care unit, International Journal of Environmental Research and Public Health, 17, Epub ahead of print 2020, doi: 10.3390/ijerph17062109.
- [3] Howden B.P, Giulieri S.G, Wong Fok Lung T et al, Staphylococcus aureus host interactions and adaptation, Nature Reviews Microbiology, 21, Epub ahead of print 2023, doi: 10.1038/s41579-023-00852-y.
- [4] David M.Z.S, Treatment of Staphylococcus aureus, Assess Eval High Educ, 2012, 37: 435.
- [5] David M.Z, Daum R.S, Treatment of Staphylococcus aureus Infections, In: Bagnoli F, Rappuoli R, Grandi G (eds) Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 325-383.
- [6] Kadariya J, Smith T.C, Thapaliya D, Staphylococcus aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health, Biomed Res Int 2014, 2014: 827965.
- [7] Lam J.C, Stokes W, The Golden Grapes of Wrath - Staphylococcus aureus Bacteremia: A Clinical Review, American Journal of Medicine, 136, Epub ahead of print 2023, doi: 10.1016/j.amjmed.2022.09.017.
- [8] Misra N, Pu X, Holt D.N et al, Immunoproteomics to identify Staphylococcus aureus antigens expressed in bovine milk during mastitis, J Dairy Sci 2018, 101: 6296-6309.
- [9] Lee A.S, De Lencastre H, Garau J et al, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Nat Rev Dis Primers 2018, 4: 1-23.
- [10] Cheung G.Y.C, Bae J.S, Otto M, Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus, Virulence, 12, Epub ahead of print 2021, doi: 10.1080/21505594.2021.1878688.
- [11] Huletsky A, Giroux R, Rossbach V et al, New Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Directly from Specimens Containing a Mixture of Staphylococci, J Clin Microbiol, 2004, 42: 1875-1884.
- [12] Luteijn J.M, Hubben G.A.A, Pechlivanoglou P et al, Diagnostic accuracy of culture-based and PCR-based detection tests for methicillin-resistant Staphylococcus aureus: A meta-analysis, Clinical Microbiology and Infection, 2011, 17: 146-154.
- [13] Okolie C.E, Wooldridge K.G, Turner D.P.J.J et al, Development of a heptaplex PCR assay for identification of Staphylococcus aureus and CoNS with simultaneous detection of virulence and antibiotic resistance genes, BMC Microbiol, 2015, 15: 157.
- [14] Milheiriço C, Oliveira D.C, De Lencastre H, Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in Staphylococcus aureus, Antimicrob Agents Chemother, Epub ahead of print, 2007, doi: 10.1128/AAC.00275-07.
- [15] DeLeo F.R, Otto M, Kreiswirth B.N et al, Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus, The Lancet, 2010, 375: 1557-1568.
- [16] Sheet O.H, Grabowski N.T, Klein G et al, Development and validation of a loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Staphylococcus aureus in bovine mastitis milk samples, Mol Cell Probes, 2016, 30: 320-325.
- [17] Ou A, Wang K, Mao Y et al, First Report on the Rapid Detection and Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Viable but Non-culturable (VBNC) Under Food Storage Conditions, Front Microbiol, 2021, 11: 1-7.
- [18] Liu W, Dong D, Yang Z et al, Polymerase Spiral Reaction (PSR): A novel isothermal nucleic acid amplification method, Sci Rep, 2015, 5: 12723.
- [19] Geng Y, Liu S, Wang J et al, Rapid Detection of Staphylococcus aureus in Food Using a Recombinase Polymerase Amplification-Based Assay, Food Anal Methods, 2018, 11: 2847-2856.
- [20] Tran D.H, Tran H.T, Le U.P et al, Direct colorimetric LAMP assay for rapid detection of African swine fever virus: A validation study during an outbreak in Vietnam, Transbound Emerg Dis, 2021, 68: 2595-2602.
- [21] Abdullah J, Saffie N, Sjasri F.A.R et al, Rapid detection of Salmonella typhi by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method, Brazilian Journal of Microbiology, 2014, 45: 1385-1391.
- [22] Torigoe H, Seki M, Yamashita Y et al, Detection of Haemophilus influenzae by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of the outer membrane protein P6 gene, Jpn J Infect Dis, 2007, 60: 55-58.

- [23] Kim H.J, Kim YJ, Yong D.E et al, Loop-mediated isothermal amplification of vanA gene enables a rapid and naked-eye detection of vancomycin-resistant enterococci infection, J Microbiol Methods, 2014, 104: 61-66.
- [24] Tang C.T, Nguyen D.T, Hoa N.T et al, An outbreak of severe infections with community-acquired MRSA carrying the panton-valentine leukocidin following vaccination, PLoS One, 2, Epub ahead of print, 2007, doi: 10.1371/journal.pone.0000822.
- [25] Otto M, Community-associated MRSA: What makes them special? International Journal of Medical Microbiology, Epub ahead of print, 2013, doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.007.
- [26] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H et al, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, Nucleic Acids Res, 2000, 28: e63-e63.
- [27] Abusheraida N.S.A, AlBaker A.A.H, Aljabri A.S.A et al, Rapid Visual Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Human Clinical Samples via Closed LAMP Assay Targeting *mecA* and *spa* Genes, Microorganisms, 12, Epub ahead of print 2024, doi: 10.3390/microorganisms12010157.
- [28] Emara M.M.M, Ghoname N.F, Ramadan M.O et al, Evaluation of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of methicillin resistant Staphylococcus aureus in Tanta University Hospitals in Egypt, Microbes and Infectious Diseases, 2023, 4: 1219-1231.

