

# Một xét nghiệm Polymerase Spiral Reaction mới để phát hiện nhanh các gen *Staphylococcus aureus* kháng penicillin

Vũ Quang Hiếu<sup>1</sup>, Phan Văn Thạch<sup>1</sup>, Trần Hồng Diễm<sup>1</sup>, Trần Thị Quỳnh Như<sup>2</sup>, Đặng Hữu Nghĩa<sup>2</sup>, Nguyễn Hồng Phúc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành

<sup>2</sup>Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

vqhiu@ntt.edu.vn

## Tóm tắt

Bài báo đã phát triển phương pháp trực quan phản ứng phân tử nhằm phát hiện chủng *Staphylococcus aureus* kháng penicillin dựa trên phản ứng xoắn ốc polymerase (PSR). Phương pháp này thực hiện phản ứng trong điều kiện đẳng nhiệt bằng cách sử dụng enzyme Bst DNA polymerase và hai cặp mồi được thiết kế nhắm mục tiêu vào gen *blaZ* mã hóa tính kháng penicillin ở *S. aureus*. Khi khảo sát điều kiện phản ứng cho thấy, ở nhiệt độ 65 °C và nồng độ cặp mồi F2/R2 = 0,1 μM và F1-Nr/R1-N = 1,6 μM, thì phản ứng PSR cho kết quả tối ưu chỉ trong vòng 50 phút. Giới hạn phát hiện của phương pháp PSR với DNA bộ gen và tế bào vi khuẩn lần lượt là 10 pg/μL và 5 CFU/mL trên mỗi phản ứng, nhạy hơn so với phương pháp PCR. Ngoài ra, phương pháp này có tính đặc hiệu cao, do không xảy phản ứng chéo với các chủng vi khuẩn gây bệnh khác. Kết quả cho thấy phương pháp xét nghiệm PSR dễ thực hiện, có độ tin cậy cao; nên được ứng dụng để kiểm tra và khảo sát thực trạng kháng penicillin của *S. aureus* trong bệnh viện và cộng đồng.

Nhận 27/12/2022

Được duyệt 15/04/2023

Công bố 25/06/2023

## Từ khóa

*Staphylococcus aureus*, Polymerase Spiral Reaction, penicillin, gen *blaZ*

© 2023 Journal of Science and Technology - NTTU

## 1 Đặt vấn đề

Nhiễm khuẩn huyết là một trong nhiều bệnh nhiễm trùng do *Staphylococcus aureus* gây ra và có tỉ lệ tử vong trong 30 ngày lên tới 27 % [1]. Hiện nay, mặc dù tỉ lệ nhạy cảm với penicillin của *S. aureus* tương đối thấp, dao động từ 5 % đến 20 %, nhưng penicillin vẫn được ưu tiên lựa chọn trong các trường hợp nhiễm *S. aureus* nhạy cảm với penicillin nhờ hiệu quả điều trị cao [2-4]. Do đó, việc chẩn đoán kịp thời và chính xác là cần thiết để đưa ra hướng điều trị thích hợp và kiểm soát sự bùng phát của dịch bệnh.

Khả năng kháng penicillin ở *S. aureus* biểu hiện chủ yếu thông qua tổng hợp β-lactamase được mã hóa bởi gen *blaZ*, với bốn biến thể của β-lactamase (A, B, C và D) [5,6]. Đến nay, một số phương pháp phát hiện dựa

trên hình dạng hay dựa trên mục tiêu tổng hợp β-lactamase đã được nghiên cứu phát triển, tuy nhiên phương pháp phát hiện gen *blaZ* bằng PCR được xem là tiêu chuẩn đánh giá các chủng PSSA phân lập từ các trường hợp nhiễm trùng trầm trọng cần điều trị bằng penicillin nhờ độ nhạy vượt trội [7]. Mặc dù vậy, phương pháp PCR hiện nay tương đối phức tạp, tốn nhiều thời gian và đòi hỏi các dụng cụ và máy móc chuyên dụng, đắt tiền và cần chuyên gia. Vì vậy, việc phát triển một phương pháp mới, đơn giản, tiết kiệm chi phí nhưng vẫn đạt hiệu quả cao là cần thiết.

Polymerase spiral reaction (PSR) là phương pháp khuếch đại axit nucleic mới được phát triển bởi Liu và cộng sự năm 2015 [8]. PSR cho phép thực hiện trong điều kiện đẳng nhiệt mà vẫn đảm bảo đáp ứng các tiêu



chỉ về độ nhạy và độ đặc hiệu. So sánh với những phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt khác, PSR không cần biến tính DNA ở nhiệt độ 95 °C hoặc sử dụng enzyme DNA helicase trong quá trình biến tính chuỗi xoắn kép DNA. Hiện nay, các nghiên cứu và áp dụng phương pháp PSR ngày càng phổ biến trong phát hiện các tác nhân gây bệnh trên người và động vật [9,10]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào sử dụng phương pháp này để phát hiện gen *blaZ*, một gen đặc hiệu cho tính kháng penicillin của *S. aureus*. Do vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là phát triển phương pháp PSR trong phát hiện các chủng *S. aureus* kháng penicillin.

## 2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1 Vật liệu

#### 2.1.1 Chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *S. aureus* (ATCC 29213) mang gen *blaZ* được sử dụng làm đối chứng dương. Các chủng vi khuẩn khác được nhận từ Phòng Vi sinh, Viện Kỹ thuật Công nghệ cao Nguyễn Tất Thành.

#### 2.1.2 Hóa chất

Hóa chất dùng trong các kỹ thuật sinh học phân tử gồm bộ kit PCR và WarmStart Colorimetric Lamp 2X Master Mix của hãng New England Biolabs (UK), gel agarose của hãng Bioline (UK), và nước khử ion (miliQ, Merch, Germany).

#### 2.1.3 Môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Các môi trường được sử dụng để nuôi cấy vi sinh gồm TSA – Tryptic Soy Agar và TSB – Tryptic Soy Broth (Merch, Germany), Agar và NaCl (Biopharmaceuticals & Titrimetry).

## 2.2 Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1 Thiết kế mồi

Các đoạn mồi sử dụng trong phương pháp PSR được thiết kế để nhắm mục tiêu vào vùng bảo tồn trên gen *blaZ* của *S. aureus* bằng cách sử dụng chương trình Primer Explorer (<https://primerexplorer.jp/e/>). Nguyên tắc của thiết kế mồi PSR đã được mô tả trong nghiên cứu [8]. Tính đặc hiệu của mồi được kiểm tra *in silico* bằng công cụ BLAST trên NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Các đoạn mồi mục tiêu được tổng hợp từ Công ty Sinh hóa Phù Sa (Việt Nam).

### 2.2.2 Tách chiết DNA

DNA được tách chiết từ vi khuẩn dựa trên phương pháp CTAB của Minas và cộng sự (2011) [11]. Chỉ số hấp thụ (OD) tại bước sóng 260 nm và 280 nm được xác

định bằng máy đo quang phổ Jenway (UK). Thông thường, tỉ số OD<sub>260/280</sub> từ 1,8 đến 2,2 cho thấy DNA tách chiết có độ tinh sạch cao và đáp ứng tiêu chuẩn sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR và PSR.

### 2.2.3 PCR khuếch đại gen *blaZ*

Phản ứng PCR với tổng thể tích cuối cùng là 20  $\mu$ L được thiết lập bao gồm 0,4  $\mu$ L (10  $\mu$ M) cho mỗi loại mồi; 2  $\mu$ L DNA mẫu (50 ng/ $\mu$ L) 0,1  $\mu$ L enzyme *Taq* DNA polymerase; 0,4  $\mu$ L dNTPs (10 mM); 4  $\mu$ L OneTaq Standard Reaction Buffer (5X); và nước khử ion. Phản ứng sau đó được thực hiện bằng máy PCR (Cole-Parmer Ltd, UK) với chu trình luân nhiệt như sau: 1 chu kỳ tiền biến tính ở 95 °C (5 phút); 40 chu kỳ bao gồm bước biến tính ở 95 °C (15 giây), bắt cặp ở 53,7 °C (15 giây) và kéo dài ở 68 °C (15 giây); sau đó là hậu kéo dài ở 72 °C (5 phút). Kết quả PCR được quan sát thông qua kỹ thuật điện di. Sản phẩm sau khuếch đại được nạp vào các giếng trên gel agarose (1,5 %) trong dung dịch đệm TBE và chạy ở một điện thế không đổi 75 V. Sau 75 phút, gel được nhuộm bằng GelRed và chụp bằng hệ thống Cleaver Scientific - (UK). Ngoài ra, sản phẩm của phản ứng PCR được giải trình tự tại Công ty VNDAT. Các phần mềm tin sinh học Bioedit, Seaview và Blast được sử dụng để phân tích kết quả giải trình tự.

### 2.2.4 Thiết lập phản ứng PSR

Nồng độ thành phần của phản ứng được thiết lập theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hỗn hợp 15  $\mu$ L mỗi phản ứng PSR bao gồm 0,3  $\mu$ L mỗi mồi F2/R2 với nồng độ 10  $\mu$ M; 2,4  $\mu$ L mỗi mồi F1-Nr/R1-N với nồng độ 10  $\mu$ M; 0,3  $\mu$ L mỗi mồi F2/R2 với nồng độ 10  $\mu$ M; 7,5  $\mu$ L LAMP master mix; 1  $\mu$ L DNA mẫu với nồng độ 6 ng/ $\mu$ L và nước khử ion. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở điều kiện nhiệt độ 65 °C trong 60 phút bằng máy ủ nhiệt khô. Đánh giá kết quả phản ứng dựa trên sự đổi màu trong ống nghiệm, kết quả sau đó được kiểm chứng lại bằng kỹ thuật điện di.

### 2.2.5 Tối ưu hóa phản ứng PSR

Các thông số kỹ thuật được tối ưu bao gồm thời gian, nhiệt độ, và nồng độ các cặp mồi.

#### 2.2.5.1 Khảo sát nhiệt độ tối ưu

Nhiệt độ được thiết lập theo gradient từ (58-68) °C với mỗi thông số cách 1 °C bằng máy PCR. Các yếu tố còn lại không thay đổi, nhiệt độ tối ưu sau khảo sát được sử dụng cố định cho các bước khảo sát các thông số khác.

#### 2.2.5.2 Khảo sát thời gian tối ưu

Nhiệt độ tối ưu, nồng độ và các yếu tố khác được giữ nguyên, thời gian phản ứng được khảo sát trong khoảng từ 30 phút đến 60 phút với mỗi nghiệm thức được thiết lập cách nhau một khoảng 5 phút. Thời gian tối ưu được chọn để khảo sát tiếp nồng độ môi.

### 2.2.5.3 Khảo sát nồng độ môi tối ưu

Cặp môi F2/R2 và F1-Nr/R1-N được khảo sát trong các khoảng nồng độ lần lượt là (0,05-0,2 và 0,4-3,2)  $\mu\text{M}$ , được mô tả chi tiết các nghiệm thức theo Bảng 1. Phản ứng sử dụng nhiệt độ tối ưu, thời gian tối ưu và không thay đổi các yếu tố khác.

**Bảng 1** Ma trận nghiệm thức trong khảo sát nồng độ môi

F2/R2 ( $\mu\text{M}$ )	F1-Nr/R1-N ( $\mu\text{M}$ )				
	0,4	0,8	1,6	2,4	3,2
0,05	1	2	3	4	5
0,1	6	7	8	9	10
0,2	11	12	13	14	15

Trong đó, các số 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 và 15 là các nghiệm thức khảo sát ở các nồng độ môi tương ứng.

2.2.6 Khảo sát giới hạn phát hiện (LOD) và độ đặc hiệu  
Pha loãng liên tiếp dung dịch DNA tổng và dung dịch tế bào vi khuẩn ban đầu để đánh giá LOD của phản ứng PSR. LOD được ghi nhận dựa vào sự thay đổi màu chỉ thị pH ở nồng độ mẫu thấp nhất của phản ứng. Độ đặc hiệu của xét nghiệm PSR được đánh giá bằng cách sử dụng DNA tổng số từ các vi khuẩn khác gồm: *escherichia coli*, *enterococcus faecalis*, *salmonella*, *vibrio parahaemolyticus*, *vibrio cholera*, *streptococcus pyogenes*, *pseudomonas aeruginosa* và *bacillus subtilis*.

## 3 Kết quả và thảo luận

### 3.1 Kết quả

#### 3.1.1 Thiết kế môi

Các cặp môi được thiết kế nhắm trình tự gene *blaZ* của *S. aureus* bằng phần mềm Primer Explorer v.5. Các đặc tính vật lý như chiều dài, nhiệt độ nóng chảy, tỉ lệ % GC được phân tích bằng phần mềm OligoAnalyzer và kiểm tra độ đặc hiệu bằng BLAST. Các cặp môi được chọn đều đáp ứng các yêu cầu nêu trên và có trình tự như Bảng 2.

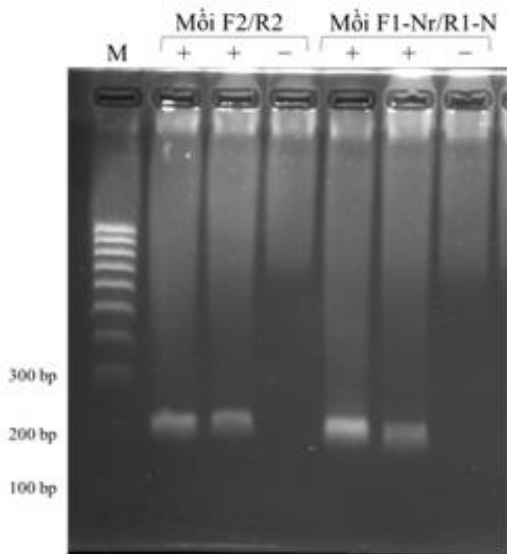
**Bảng 2** Trình tự môi được sử dụng trong phản ứng PCR và PSR

Tên môi	Độ dài (bp)	Trình tự (5'-3')
F2	18	CATTACACTCTTGCGCGGT
R2	24	CGGAGATACTTTAATTAAGATGG
F1-Nr	45	gattcgtacatagaaggatccCACTTATCAACTTATCATTTGGCT
R1-N	40	cctaggaagatacatgcttagAAAGACTGTAAGGTGGCTG

#### 3.1.2 PCR khuếch đại gen *blaZ*

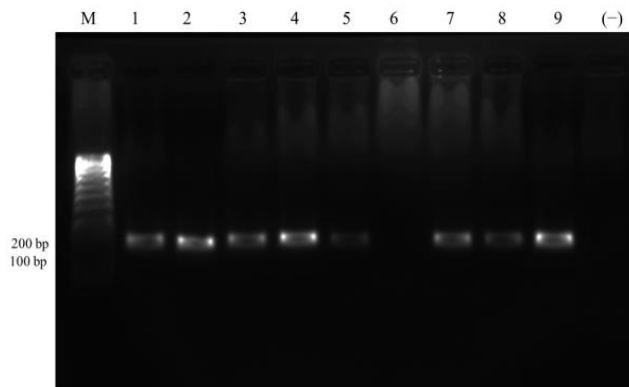
Để kiểm tra khả năng bắt cặp đặc hiệu của các cặp môi với gen *blaZ*, mẫu chuẩn *S. aureus* (ATCC 29213) mang gen *blaZ* và chủng *S. aureus* kháng penicillin (07088) được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR trong cùng một chu trình nhiệt. Kết quả từ Hình 1 chỉ ra các giếng 2 và giếng 3 xuất hiện một dải duy nhất có kích thước khoảng 214 bp, trong khi các giếng 5 và giếng 6 xuất hiện dải có

kích thước khoảng 200 bp so với thang DNA chuẩn, hoàn toàn trùng khớp với kết quả thiết kế primer của hai cặp môi dựa theo trình tự gen *blaZ* công bố trên NCBI. Điều đó cho thấy các cặp môi được thiết kế đã thành công khuếch đại đoạn acid nucleic có kích thước tương đương với kích thước gen *blaZ*.



**Hình 1** Kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng hai cặp mồi. M: thang 100 bp; (+) ATCC 29213; (+) 07088; (-) đối chứng âm; (+) ATCC 29213; (+) 07088; (-) đối chứng âm.

Nhằm khảo sát khả năng sàng lọc và độ đặc hiệu của cặp mồi F2/R2 phản ứng PCR được tiến hành. 12 chủng *S. aureus* được phân lập và cung cấp từ Phòng thí nghiệm Vi sinh (Viện Công nghệ cao, Đại học Nguyễn Tất Thành) cùng mẫu đối chứng dương là chủng *S. aureus* (ATCC 29213) mang gen *blaZ*, trong khi đó nước khử ion được sử dụng làm đối chứng âm. Các chủng *S. aureus* được nuôi cấy và tách chiết DNA dùng làm khung cho phản ứng PCR.



**Hình 2** Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi F2/R2 (M) thang 100 bp; (1) 07088; (2) 07088 VR1; (3) 07088 VR2; (4) 04772; (5) 42335; (6) 50426; (7) 43495; (8) 06949; (9) ATCC 29213; (-) đối chứng âm.

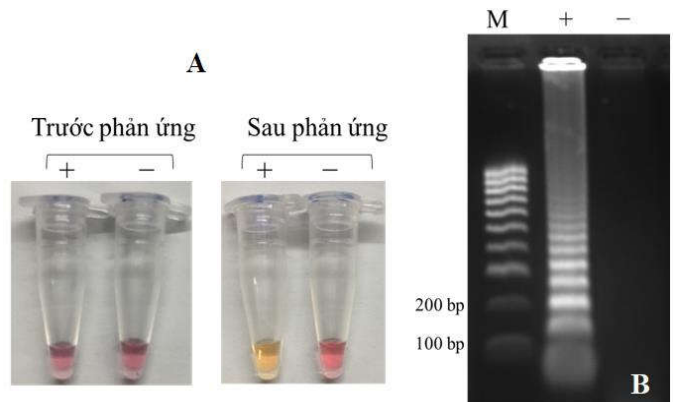
Từ Hình 2 cho thấy, các giếng 1, 2, 3, 4, 5, 7 và 8 xuất hiện dải sáng có cùng kích thước khoảng 214 bp với giếng 9 mang đối chứng dương, trong khi đó giếng 6 và giếng đối chứng âm không có sự xuất hiện của dải sáng. Trong 8 chủng được phân lập ngoại trừ chủng

50426 (giếng 6) không mang gen *blaZ* các chủng còn lại đều mang gen *blaZ*, tức tỉ lệ mang gen *blaZ* khoảng 12,5 %. Những kết quả nêu trên đã chứng tỏ cặp mồi được thiết kế đảm bảo tính đặc hiệu và có thể sử dụng để phát triển phương pháp PSR.

Nhằm kiểm chứng đoạn gen được khuếch đại là gen *blaZ*, sản phẩm PCR của mồi F1-Nr và R1-N được tiến hành giải trình tự. Kết quả phân tích bằng phần mềm Bioedit cho thấy các peak giải trình tự được tạo ra ổn định và có độ tinh sạch tốt. Thể hiện các nucleotide trong sản phẩm được xác định rõ ràng và có độ tin cậy (dữ liệu không trình bày). Kết quả sắp giống cột bằng phần mềm SeaView chỉ ra rằng sản phẩm PCR hoàn toàn giống với trình tự gen *blaZ* trên NCBI được dùng để thiết kế mồi. Đồng thời, so sánh với các trình tự có sẵn trên NCBI bằng phần mềm Blast cho thấy các đoạn acid nucleic này cho độ tương đồng đến 100 % với đoạn trình tự của gen *blaZ* trên *S. aureus*. Điều đó một lần nữa khẳng định sản phẩm PCR từ chủng vi khuẩn *S. aureus* ATCC 29213 là gen *blaZ*. Do vậy, có thể kết luận rằng các cặp mồi được thiết kế đã khuếch đại gen *blaZ* trên *S. aureus*.

### 3.1.3. Thiết lập phản ứng PSR

Thí nghiệm sơ bộ được thiết lập nhằm kiểm tra các thành phần trong phản ứng PSR. Theo đó, phản ứng được tiến hành ở 65 °C trong 50 phút.

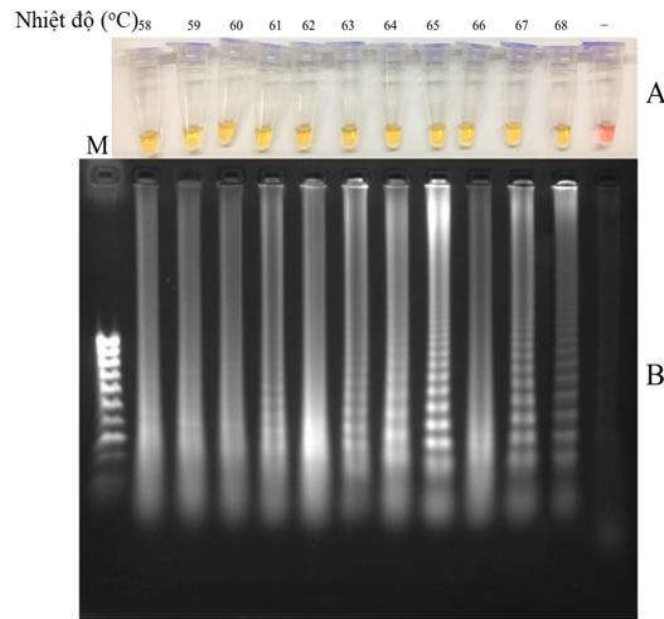


**Hình 3** Kết quả kiểm tra các thành phần phản ứng PSR A) Phản ứng đổi màu khi quan sát bằng mắt thường, B) Kiểm tra phản ứng bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose: (-) ATCC 29213; (-) đối chứng âm và (M) thang 100 bp

Từ Hình 3A cho thấy, có sự biến đổi màu từ hồng sang cam sau thời gian ủ ở đối chứng dương (ATCC 29213), ngược lại đối chứng âm không làm thay đổi màu ban đầu sau thời gian phản ứng. Sự thay đổi màu sắc cho thấy phản ứng PSR đã tạo ra một lượng lớn sản phẩm, giải phóng ion H<sup>+</sup> làm giảm pH dẫn tới thay đổi màu

sắc chất chỉ thị. Đối chiếu kết quả điện di Hình 3B cho thấy có một dải mờ (smear) kéo dài mẫu đối chứng dương, nhưng không thấy ở mẫu đối chứng âm. Sự hiện diện dải mờ với kích thước khác nhau cho thấy các phản ứng PSR đã tạo ra cấu trúc xoắn ốc đặc trưng tương đương với số vòng lặp được tạo ra của phản ứng kéo chuỗi. Vì vậy, kỹ thuật PSR đã thiết lập hoàn toàn có thể sử dụng để phát hiện gen *blaZ* của vi khuẩn *S. aureus*.

### 3.1.4 Khảo sát các điều kiện của phản ứng PSR



**Hình 4** Kết quả khảo sát nhiệt độ phản ứng PSR

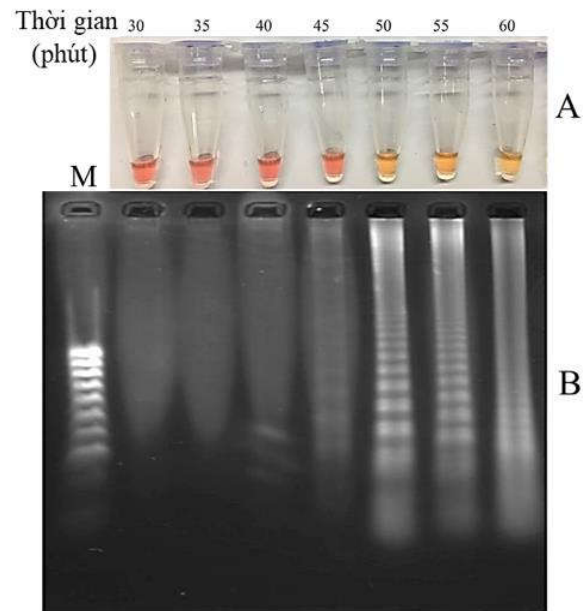
A) Phản ứng đổi màu quan sát bằng mắt thường.

B) Kiểm tra kết quả phản ứng bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose: (M) thang 100 bp; (58-68) sản phẩm PSR ở các nhiệt độ từ 58 °C đến 68 °C; (-) đối chứng âm.

Nhiệt độ cao hoặc thấp có thể làm tăng hoặc giảm độ đặc hiệu và hiệu suất của phản ứng. Ở đây, phản ứng PSR được khảo sát trong khoảng nhiệt độ từ 55 °C đến 68 °C, mỗi khoảng cách nhau 1 °C. Quan sát các ống nghiệm sau phản ứng cho thấy có sự chuyển đổi màu sắc ở hầu hết các nhiệt độ khảo sát. Tương tự, các dải smear kéo dài hiện diện ở tất cả các nhiệt độ khảo sát. Đặc biệt, ở nhiệt độ 65 °C, kết quả điện di cho dải sáng và rõ nhất, điều đó chứng tỏ sau phản ứng đã tạo được số lượng lớn sản phẩm khuếch đại. Vì vậy, 65 °C được chọn là nhiệt độ thích hợp cho phản ứng do có hiệu suất khuếch đại là cao nhất.

Thời gian phản ứng PSR quyết định số lượng bản sao DNA sau phản ứng. Quan sát kết quả phản ứng cho thấy sự biến đổi màu sắc được nhận biết rõ ràng sau 50 phút

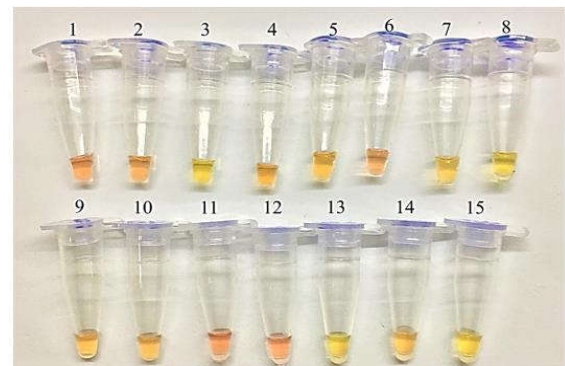
(Hình 5A). Thêm vào đó, chạy điện di sản phẩm sau phản ứng cho thấy các dải sáng xuất hiện rõ sau 50 phút phản ứng, ngược lại, trong thời gian (30-45) phút chỉ xuất hiện các dải mờ, do phản ứng chưa hoàn toàn nên số lượng sản phẩm khuếch đại còn hạn chế. Đặc biệt, các dải rõ và sáng nhất ở thời điểm 50 phút, chứng tỏ đây là thời gian ngắn nhất nhưng vẫn cho hiệu suất khuếch đại tốt nhất.



**Hình 5** Kết quả khảo sát thời gian phản ứng PSR

A) Phản ứng đổi màu khi quan sát bằng mắt thường.

B) Kiểm tra kết quả phản ứng bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose: (M) thang 100 bp; (30-60) sản phẩm PSR lần lượt sau (30-60) phút; (-) đối chứng âm.



**Hình 6** Khảo sát nồng độ môi quan sát bằng mắt thường: (1-15) sản phẩm PSR tương ứng các nghiệm thức ở Bảng 1.

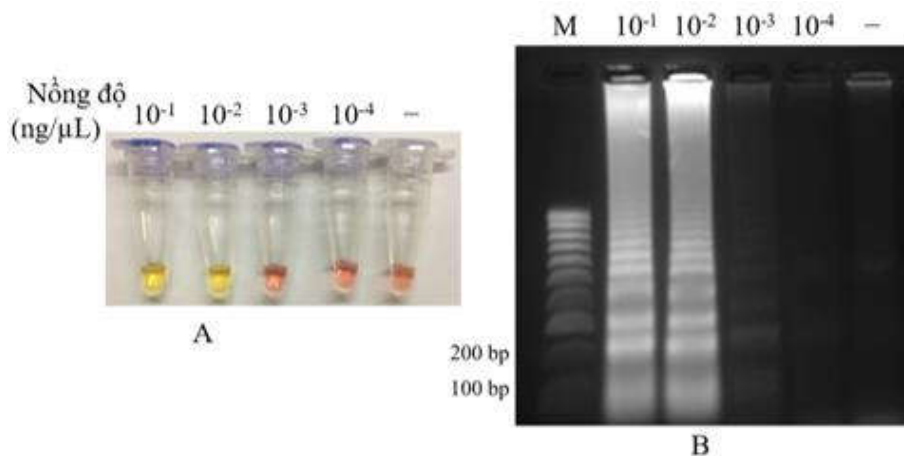
Dựa trên nhiệt độ và thời gian thích hợp nhất của phản ứng, nồng độ môi phù hợp tiếp tục được khảo sát. Trong đó, nồng độ (0,4-3,2)  $\mu\text{M}$  và (0,05-0,2)  $\mu\text{M}$  lần lượt là nồng độ khảo sát của hai cặp môi F1-Nr/R1-N và cặp môi F2/R2 tạo thành 15 nghiệm thức. Quan sát kết quả ở Hình 6 cho thấy, đa số các nghiệm thức đều

có sự thay đổi màu sắc, đặc biệt nghiệm thức 8 có sự biến đổi màu sắc rõ ràng nhất. Từ những kết quả trên, phản ứng PSR khuếch đại gen *blaZ* cho kết quả rõ nhất sau 50 phút phản ứng trong điều kiện nhiệt độ 65 °C, nồng độ mỗi F2/R2 và F1-Nr/R1-N lần lượt là 0,1 μM và 1,6 μM.

### 3.1.5 LOD của phản ứng PSR

Dựa trên những kết quả có được sau quá trình khảo sát phản ứng PSR, LOD DNA tổng số và tế bào vi khuẩn của chủng ATCC 29213 được thực hiện. Hình 7A cho

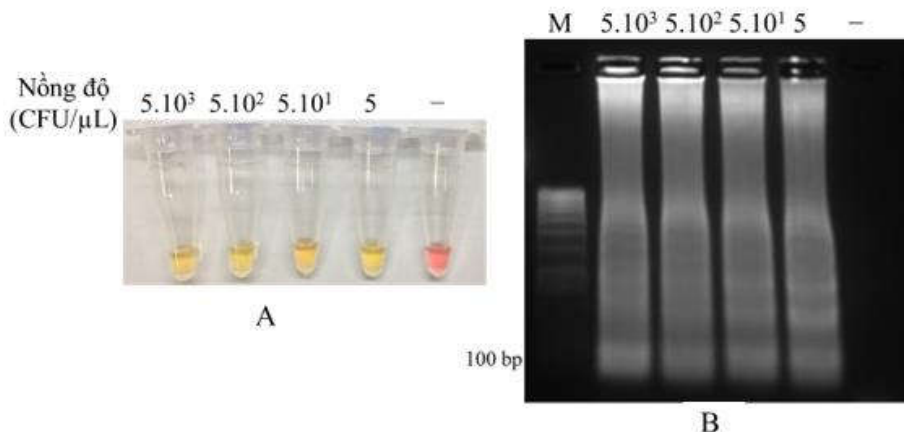
thấy màu của phản ứng thay đổi ở nồng độ ( $10^{-1}$  và  $10^{-2}$ ) ng/μL, nhưng không có dấu hiệu thay đổi màu ở nồng độ ( $10^{-3}$  và  $10^{-4}$ ) ng/μL. Từ kết quả điện di, các dải sáng rõ xuất hiện ở nồng độ ( $10^{-1}$  và  $10^{-2}$ ) ng/μL. Trong khi đó ở nồng độ  $10^{-3}$  ng/μL vẫn xuất hiện các dải mờ, cho thấy phản ứng đã tạo ra một số lượng ít sản phẩm PSR nhưng chưa đủ để làm thay đổi màu sắc phản ứng. Do đó,  $10^{-2}$  ng/μL chính là nồng độ DNA nhỏ nhất có thể phát hiện bằng phản ứng PSR.



**Hình 7** Kết quả khảo sát LOD DNA tách chiết  
 A) Phản ứng đổi màu quan sát bằng mắt thường, B) Kiểm tra kết quả phản ứng bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose: (M) thang 100 bp, (-) đối chứng âm; ( $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ) sản phẩm PSR tương ứng với các nồng độ DNA pha loãng ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  và  $10^{-4}$ ) ng/μL.

LOD đối với tế bào vi khuẩn được xác định là số lượng vi khuẩn thấp nhất cho kết quả phản ứng PSR dương tính. Vi khuẩn sau quá trình nhân sinh khối được pha loãng bậc 10 từ ( $5 \times 10^3$  xuống 5) CFU/μL. Quan sát kết quả cho thấy, sự thay đổi màu sắc xuất hiện ở tất cả

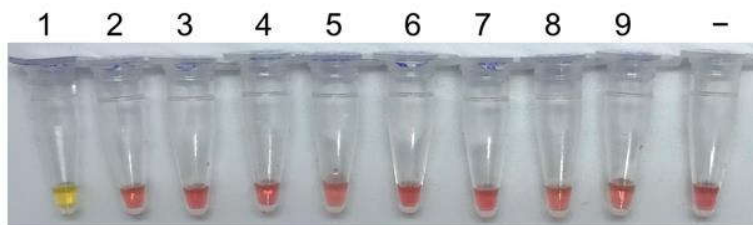
nồng độ pha loãng, trong khi đó mẫu đối chứng âm không thay đổi màu sắc so với ban đầu (hồng). Kết quả này không cho phép xác định LOD nồng độ tế bào, tuy nhiên có thể kết luận phương pháp PSR cho phép phát hiện *blaZ* ở nồng độ rất thấp, chỉ 5 CFU/μL.



**Hình 8** Kết quả khảo sát LOD tế bào vi khuẩn. A) Phản ứng đổi màu khi quan sát bằng mắt thường, B) Kiểm tra kết quả phản ứng bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose. Trong đó: (-) đối chứng âm; ( $5 \times 10^5$  xuống 5) sản phẩm PSR tương ứng với nồng độ tế bào vi khuẩn là ( $5 \times 10^5$  xuống 5) tế bào/μL.

### 3.1.6 Độ đặc hiệu của phản ứng PSR

Mẫu DNA từ các chủng vi khuẩn gây bệnh phổ biến bao gồm: *Escherichia coli*; *Enterococcus faecalis*; *Salmonella*; *Vibrio parahaemolyticus*; *Vibrio cholera*; *Streptococcus pyogenes*; *Pseudomonas aeruginosa*; và *Bacillus subtilis* đã được thử nghiệm để đánh giá độ đặc hiệu của phản ứng PSR. Kết quả quan sát cho thấy,



**Hình 9** Khảo sát độ đặc hiệu. (1) *Staphylococcus aureus* (-); (2) *Escherichia coli*; (3) *Enterococcus faecalis*; (4) *Salmonella sp.*; (5) *Vibrio parahaemolyticus*; (6) *Vibrio cholera*; (7) *Streptococcus pyogenes*; (8) *Pseudomonas aeruginosa*; (9) *Bacillus subtilis*; (-) đối chứng âm.

### 3.2. Thảo luận

Trong nghiên cứu này, phương pháp dựa trên các phản ứng trùng hợp vòng xoắn PSR cho phép phát hiện gen kháng penicillin của các chủng *S. aureus* được nghiên cứu ứng dụng. Nhờ các cặp mồi được thiết kế chuyên biệt vừa bắt đặc hiệu với gen mục tiêu, vừa có thể tạo các đoạn trình bổ sung ở hai đầu đoạn gen mới, cho phép chúng bắt cặp bổ sung tạo các vòng xoắn kéo dài. Độ đặc hiệu của các cặp mồi được đánh giá sơ bộ bằng phản ứng PCR. Kết quả cho thấy, các cặp mồi được thiết kế đã khuếch đại đoạn gen có kích thước tương đương kích thước gen *blaZ* trên các chủng *S. aureus* kháng penicillin. Đồng thời, kết quả giải trình tự sản phẩm PCR cho độ tương đồng tuyệt đối với gen *blaZ*, điều này đã chứng minh độ đặc hiệu của cặp mồi. Bên cạnh đó, phương pháp PSR sử dụng (1-2) cặp mồi thay vì (2-4) cặp mồi như trong phương pháp LAMP đã giúp cho việc thiết kế mồi trở nên đơn giản, hạn chế hiện tượng primer-dimer và giúp tiết kiệm chi phí.

Trong khi phương pháp PCR truyền thống đòi hỏi các máy điều nhiệt phức tạp, công kênh và chi phí cao, phương pháp PSR chỉ cần các thiết bị gia nhiệt đơn giản, giá thành thấp, do đó, đây là lựa chọn hợp lý trong phát hiện và sàng lọc tác nhân gây bệnh tại vùng sâu vùng xa. Bên cạnh yếu tố nhiệt độ, thời gian phản ứng nhanh cũng là ưu điểm của phương pháp PSR. Trong khi phương pháp PCR truyền thống cần khoảng (120-140) phút để trả kết quả, phương pháp PSR cho kết quả trực tiếp chỉ sau 50 phút, với nhiệt độ ủ 65 °C mà không cần trải qua bước điện di sản phẩm, do đó giúp tiết kiệm chi phí, công sức và thời gian. Mặc dù vậy, nhiệt độ,

ngoài chủng *Staphylococcus aureus*, các chủng vi khuẩn còn lại và đối chứng âm không làm thay đổi màu phản ứng. Điều này chỉ ra rằng, phương pháp PSR được thiết lập trong nghiên cứu này chỉ phát hiện vi khuẩn *S. aureus* mang gene *blaZ*, và không phát hiện chéo các loài vi khuẩn thử nghiệm khác (Hình 9).

nồng độ mồi và thời gian phản ứng là những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến độ hiệu suất của phản ứng PSR, cần được điều chỉnh phù hợp với các điều kiện nghiên cứu trước đó của Liu và cộng sự [8]. Nghiên cứu này đã khảo sát thành công các điều kiện tối ưu cho phản ứng PSR nhằm mục tiêu gen *blaZ* trên *S. aureus*. Kết quả này là cơ sở cho các nghiên cứu phát triển quy trình hoàn chỉnh trong phát hiện và sàng lọc các chủng *S. aureus* trong cộng đồng.

Độ nhạy và độ đặc hiệu là hai tiêu chí chính để đánh giá hiệu quả của một xét nghiệm. Về độ nhạy, phương pháp PSR cho phép phát hiện khoảng  $10^{-2}$  ng/ $\mu$ L (tương ứng với 10 pg/ $\mu$ L) với mẫu DNA tinh sạch và 5 CFU/ $\mu$ L với tế bào *S. aureus*. Trong khi đó, LOD của phương pháp PCR với gen *blaZ* là 10 CFU/ $\mu$ L [12], điều này cho thấy phương pháp trong nghiên cứu này cho độ nhạy vượt trội. LOD này hoàn toàn đáp ứng yêu cầu để sử dụng làm công cụ chẩn đoán các chủng *S. aureus* kháng penicillin mà không cần bước tiền nuôi cấy. Hơn thế, kết quả âm tính của phản ứng PSR trên các chủng vi khuẩn gây bệnh phổ biến khác chứng minh độ tin tưởng cao của phương pháp.

### 4 Kết luận

Phương pháp mới PSR cho thấy tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong phát hiện và đánh giá các chủng *S. aureus* kháng penicillin một cách đơn giản, nhanh chóng và chính xác. Để tiến hành thương mại hóa, một quy trình hoàn thiện cho phép phát hiện trên các mẫu bệnh phẩm sẽ được tiến hành trong các nghiên cứu tiếp theo.

**Lời cảm ơn**

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ – Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2022.01.130/HĐ-NCKH.

**Tài liệu tham khảo**

1. Robinson, J. O., Pearson, J. C., Christiansen, K. J., Coombs, G. W., & Murray, R. J. (2009). Community-associated versus healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a 10-year retrospective review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28(4), 353-361.
2. Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*, 339(8), 520-532.
3. Nissen, J. L., Skov, R., Knudsen, J. D., Østergaard, C., Schönheyder, H. C., Frimodt-Møller, N., & Benfield, T. (2013). Effectiveness of penicillin, dicloxacillin and cefuroxime for penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a retrospective, propensity-score-adjusted case-control and cohort analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(8), 1894-1900.
4. Pereira, L. A., Harnett, G. B., Hodge, M. M., Cattell, J. A., & Speers, D. J. (2014). Real-time PCR assay for detection of *blaZ* genes in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(4), 1259-1261.
5. Olsen, J. E., Christensen, H., & Aarestrup, F. M. (2006). Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 450-460.
6. Zygmunt, D. J., Stratton, C. W., & Kernodle, D. S. (1992). Characterization of four beta-lactamases produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(2), 440-445.
7. Kaase, M., Lenga, S., Friedrich, S., Szabados, F., Sakinc, T., Kleine, B., & Gatermann, S. G. (2008). Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(6), 614-616.
8. Liu, W., Dong, D., Yang, Z., Zou, D., Chen, Z., Yuan, J., & Huang, L. (2015). Polymerase Spiral Reaction (PSR): A novel isothermal nucleic acid amplification method. *Scientific Reports*, 5(1), 1-8.
9. Das, A., Kumar, B., Chakravarti, S., Prakash, C., Singh, R. P., Gupta, V., ... & Shrinet, G. (2018). Rapid visual isothermal nucleic acid-based detection assay of *Brucella* species by polymerase spiral reaction. *Journal of Applied Microbiology*, 125(3), 646-654.
10. Dong, D., Zou, D., Liu, H., Yang, Z., Huang, S., Liu, N., ... & Huang, L. (2015). Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* targeting the *toxA* gene in intensive care unit patients from Beijing, China. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1100.
11. Minas, K., McEwan, N. R., Newbold, C. J., & Scott, K. P. (2011). Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 325(2), 162-169.
12. Olsen, J. E., Christensen, H., & Aarestrup, F. M. (2006). Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 450-460.



## A novel Polymerase Spiral Reaction assay for the rapid detection of *penicillin-resistant Staphylococcus aureus genes*

Vu Quang Hieu<sup>1</sup>, Phan Van Thach<sup>1</sup>, Tran Hong Diem<sup>1</sup>, Tran Thi Quynh Nhu<sup>2</sup>, Dang Huu Nghia<sup>2</sup>,  
Nguyen Hong Phuc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hitech Institute, Nguyen Tat Thanh University,

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, Nong Lam University, Ho Chi Minh City

vqhieu@ntt.edu.vn

**Abstract** In this study, a visual method was developed to detect and identify penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (PRSA) based on the polymerase spiral reaction (PSR). This method can be performed under isothermal conditions using Bst DNA polymerase and two-pair primers specifically designed to target the *blaZ* gene, which encodes penicillin-resistance in *S. aureus*. Investigation of reaction conditions showed that at the temperature of 65 °C and the concentration of primer pairs F2/R2 = 0.1 μM and F1-Nr/R1-N = 1.6 μM, the reaction gave optimal PSR result within only 50 minutes. The detection limit of PSR in genomic DNA and bacterial cells were 10 pg/μL and 5 CFU/mL, respectively, which were more sensitive than with standard PCR. In addition, this method was shown to be highly specific, as non-PRSA bacteria negligibly interfered with PRSA detection. These results indicated that a novel, effortless and reliable PSR assay developed in this study has potential application in the screening for penicillin-resistant of *S. aureus* in hospitals and communities.

**Keywords** *Staphylococcus aureus*, Polymerase Spiral Reaction, penicillin, gen *blaZ*