

ĐÁNH GIÁ CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN *Staphylococcus aureus* KHÁNG METHICILLIN TẠI BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG HUẾ

Nguyễn Thị Kim Chi¹, Trần Đình Bình², Nguyễn Thị Nam Liên¹,
Mai Văn Tuấn¹, Sylvain Godreuil³

(1) Khoa Vi sinh, Bệnh viện Trung ương Huế

(2) Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y Dược Huế

(3) Khoa Vi sinh, CHU Arnaud de Villeneuve, Montpellier, Cộng hòa Pháp

Tóm tắt

Mục tiêu: Để đánh giá tình hình nhiễm khuẩn do *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin và giá trị của các thử nghiệm phát hiện vi khuẩn *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy phân lập thường quy, kỹ thuật kháng sinh đồ Kirby-Bauerr, kỹ thuật phát hiện *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin bằng đĩa Oxacillin và Cefoxitin, kỹ thuật PCR xác định gen *mecA* của *Staphylococcus aureus*. **Kết quả:** Tỷ lệ phân lập *Staphylococcus aureus* cao nhất là được phân lập từ mẫu bệnh phẩm mủ 55,06%. Trong số 267 chủng *Staphylococcus aureus* phân lập được tại khoa Vi sinh, Bệnh viện Trung ương Huế tỷ lệ kháng Methicillin là 61,42%. Mức độ đề kháng các kháng sinh của các chủng *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin cao và cao hơn nhiều so với các chủng nhạy cảm Methicillin. **Kết luận:** Phương pháp khoan giấy khuếch tán sử dụng đĩa Cefoxitin 30 µg để phát hiện đề kháng Methicillin rất hiệu quả đối với *Staphylococcus aureus* (độ nhạy và độ đặc hiệu là 100%), đáng tin cậy để phát hiện *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin. **Từ khóa:** *Staphylococcus aureus*, kháng methicillin.

Abstract

EVALUATION OF THE METHODS FOR DETECTION METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus*

Nguyen Thi Kim Chi¹, Tran Dinh Binh², Nguyen Thi Nam Lien¹, Mai Van Tuan¹, Sylvain Godreuil³

(1) Dept. of Microbiology, Hue Central Hospital

(2) Dept. of Microbiology, Hue University of Medicine and Pharmacy

(3) Dept. of Microbiology, CHU Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France

Objective: To evaluate the infections that caused by Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the value of the tests to detect Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Subjects and Methods:** Used routine techniques to culture and isolate *S.aureus*, test the antibiotic sensitivity by Kirby-Bauerr, determination the Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Oxacillin and cefoxitin disc and PCR in identified the *mecA* gene *Staphylococcus aureus*. **Results:** The rate of *Staphylococcus aureus* isolated is highest which isolated from pus specimens (55.06%). In 267 strains of *Staphylococcus aureus* isolated in the Department of Microbiology, Hue Central Hospital the Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* was 61.42%. The level of antibiotic resistant strains of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is higher than that in Methicillin-sensitive strains. **Conclusion:** Cefoxitin 30 microg disk diffusion method to detect Methicillin resistance is effective for determinate Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (sensitivity and specificity are all 100.00%).

Key words: *Staphylococcus aureus* Methicillin-resistant.

- Địa chỉ liên hệ: Trần Đình Bình, email: trandinhbinhvn@yahoo.com.vn

DOI: 10.34071/jmp.2013.5.4

- Ngày nhận bài: 19/9/2013 * Ngày đồng ý đăng: 23/10/2013 * Ngày xuất bản: 30/10/2013

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Staphylococcus aureus là một tác nhân gây bệnh quan trọng ở người, liên quan đến nhiễm khuẩn ngoài bệnh viện và vai trò của nó trong nhiễm khuẩn bệnh viện cũng gia tăng trong những thập kỷ gần đây [2], [4].

Hiện tượng kháng kháng sinh của *S. aureus* đã được phát hiện từ những năm 50 của thế kỷ 20. Ban đầu là Penicillin, tiếp sau đó là Methicillin và các kháng sinh liên quan. Viện tiêu chuẩn phòng xét nghiệm và lâm sàng Hoa Kỳ (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS – nay là CLSI) đã cho biết rằng *S. aureus* kháng Methicillin có nghĩa là kháng được tất cả các β -Lactam, và có thể kháng được aminoglycosides và macrolides [9]. Vì thế việc phát hiện sớm và chính xác *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin có thể được xem như phát hiện một thông số chỉ điểm được vi khuẩn *Staphylococcus aureus* kháng đa kháng sinh và là một yếu tố quan trọng để đảm bảo cho việc điều trị hiệu quả cho bệnh nhân. Các nhà lâm sàng hoàn toàn có thể dựa vào kết quả đề kháng Methicillin của *Staphylococcus aureus* để tiên đoán là vi khuẩn đề kháng đa kháng sinh [9].

Tại Việt Nam, phần lớn các phòng xét nghiệm Vi sinh đều sử dụng các phương pháp nuôi cấy kinh điển và đĩa Oxacillin, Cefoxitin để phát hiện MRSA theo khuyến cáo của CLSI [4]. Một số tác giả đã sử dụng kỹ thuật PCR để phát hiện gen *mecA* của *Staphylococcus aureus* [2], [4]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào đề cập đến vấn đề đánh giá, so sánh các phương pháp kinh điển và kỹ thuật PCR để phát hiện MRSA.

Để đánh giá tình hình nhiễm khuẩn do *Staphylococcus aureus* kháng methicillin và giá trị của các thử nghiệm phát hiện vi khuẩn này, chúng tôi tiến hành đề tài: “**Đánh giá các phương pháp phát hiện *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin tại Bệnh viện Trung ương Huế**” nhằm đánh giá các phương pháp phát hiện *S. aureus* kháng Methicillin.

2. ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* được phân lập tại khoa Vi sinh, Bệnh viện Trung ương Huế từ bệnh phẩm trên bệnh nhân trong thời gian từ tháng 4 năm 2012 đến tháng 6 năm 2013 bằng phương pháp nuôi cấy thường quy.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang kết hợp với phòng thí nghiệm.

2.2.2. Hóa chất, sinh phẩm:

- **Các loại môi trường:** thạch máu, thạch dinh dưỡng, Chapman, canh thang BHI, Mueller Hinton Agar (MHA) và MHA + 2% NaCl...

- **Các loại vật liệu khác:** Huyết tương thô pha loãng tỉ lệ 1/4 với nước muối sinh lý vô khuẩn để thực hiện thử nghiệm Coagulase, các loại đĩa kháng sinh... để làm kháng sinh đồ.

- **Các loại hóa chất để thực hiện PCR:** gồm có $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Tris-HCl, dNTP, Taq DNA polymerase, nước cất...

2.2.3. Thiết bị, dụng cụ:

* **Thực hiện nuôi cấy, định danh và kháng sinh đồ:** Tủ ấm 35°C và 37°C, máy định danh VITEK2, máy đo độ đục DensiChek, máy trộn, tủ lạnh 2-8°C, tủ đông -20°C, máy ly tâm, tủ an toàn sinh học...

* Thực hiện PCR:

+ Micropipet với các thể tích khác nhau, đầu pipet có lọc với các kích thước khác nhau, gang tay không có bột, giá đựng ống nghiệm.

+ Ống nghiệm Eppendorf 1,5ml nắp có khóa, ống PCR 0,2ml, nồi chưng cách thủy

+ Máy ly tâm 13000 vòng/phút, máy trộn vortex, máy luân nhiệt Light Cycler 480 (Roche).

2.3. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

2.3.1. Nuôi cấy, phân lập *Staphylococcus aureus*

Các bệnh phẩm được cấy trên các môi trường đặc, lỏng tùy theo yêu cầu kỹ thuật của từng loại mẫu nghiệm theo thường quy phòng xét nghiệm khoa Vi sinh, bệnh viện Trung ương Huế.

2.3.2. Xác định độ nhạy cảm của vi khuẩn với các kháng sinh theo phương pháp khuếch tán trên thạch Kirby-Bauer [5]

2.3.3. Phát hiện *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin

2.3.3.1. Phát hiện *S.aureus* kháng Methicillin bằng thử nghiệm kháng Oxacillin: bằng phương pháp khoan giấy oxacillin 1 μ g.khuếch tán trên môi trường Mueller Hinton thêm 2% NaCl, với huyền dịch vi khuẩn trong nước muối sinh lý tương ứng 0.5 McFarland, nuôi cấy ở: 33–35°C trong 16 - 18 giờ.

Đọc kết quả: ≤ 10 mm = Đề kháng; 11-12 = Trung gian; ≥ 13 mm = Nhạy cảm [9].

2.3.3.2. Phát hiện *S.aureus* kháng Methicillin qua trung gian *mecA* sử dụng đĩa Cefoxitin: bằng phương pháp khoanh giấy cefoxitin 30µg khuếch tán trên môi trường Mueller Hinton với huyền dịch vi khuẩn được pha trong nước muối sinh lý tương ứng 0.5 McFarland, nuôi cấy ở: 33–35°C trong 16 – 18 giờ.

Đọc kết quả: ≤ 21 mm = *mecA* dương tính; ≥ 22 mm = *mecA* âm tính [9].

* Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu [15]:

TÊN	TRÌNH TỰ	GEN	KÍCH THƯỚC (bp)
NUC 1	5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3'	nuclease	278
NUC 2	5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'		
MEC 5	5'-GTA GAAATG ACT GAA CGT CCG ATA-3'	mecA	310
MEC 6	5'-CCAATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA-3'		

* Chuẩn bị Pre-Mix: gồm có nước cất, các cặp môi NUC 1 và 2, MEC 5 và 6.

* Chuẩn bị Mix Taq: có trong bộ kit Light Cycler Fast start DNA master SYBR Green, gồm có $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Tris-HCl, dNTP, Taq DNA polymerase, nước cất...

* Chuẩn bị MgCl_2 : Lắc nhẹ ống, không vortex.

* Chuẩn bị Mix cho Real Time PCR: Mỗi ống Real Time PCR bao gồm: Pre-mix 10 µl, MIX-Taq 2 µl, MgCl_2 3 µl và DNA vi khuẩn 5 µl, tổng thể tích là 20 µl.

2.3.3.3. Sử dụng kỹ thuật Real Time PCR tìm gen *mecA*

* Ly trích DNA từ mẫu vi khuẩn *Staphylococcus* đã được định danh: DNA của vi khuẩn sẽ được chuẩn bị bằng cách lấy 1 khuẩn lạc cho vào ống eppendorf có chứa 250 µl nước cất, chung cách thủy ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút. Quay ly tâm ống huyền dịch 10000 vòng/phút trong 10 phút, bỏ phần cặn lắng, lấy phần dịch nổi để sử dụng cho phản ứng PCR [2].

* Chu kỳ luân nhiệt: Bắt đầu 95°C/2 phút, sau đó là 35 chu kỳ với các giai đoạn cho mỗi chu kỳ như sau: 95°C/50 giây, 58°C/50 giây và 72°C/50 giây [2], [15].

2.4. Xử lý số liệu: Xử lý số liệu bằng phần mềm thống kê Epi-Info 2002. Phân thành nhóm DƯƠNG (MRSA dương tính với PCR) và nhóm ÂM TÍNH (MRSA âm tính với PCR) kết hợp với nhóm DƯƠNG (MRSA dương tính với Oxacillin) và nhóm ÂM TÍNH (MRSA âm tính với Oxacillin), tương tự như với Cefoxitin để tìm độ nhạy, độ đặc hiệu... [5].

	PCR dương tính	PCR âm tính	Tổng
Thử nghiệm với Oxacillin/Cefoxitin dương tính	A (Dương thật)	B (Dương giả)	A+B
Thử nghiệm với Oxacillin/Cefoxitin âm tính	C (Âm giả)	D (Âm thật)	C+D
Tổng	A+C	B+D	A+B+C+D

Độ nhạy: $A/(A+C)$ Độ đặc hiệu: $D/(B+D)$

Giá trị tiên đoán dương: $A/(A+B)$; Giá trị tiên đoán âm: $D/(D+C)$

Độ phù hợp chẩn đoán: $(A+D)/(A+B+C+D)$ [5].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tỷ lệ phân lập *Staphylococcus aureus* theo mẫu bệnh phẩm:

Bảng 3.1. Tỷ lệ phân lập *Staphylococcus aureus* theo mẫu bệnh phẩm

TT	Bệnh phẩm	Số lượng		MRSA		MSSA	
		n	%	n	%	n	%
1	Mủ	147	55,06	89	60,54	58	39,46
2	Đám	32	11,98	26	81,25	6	18,75
3	Dịch mũi	33	12,36	22	66,67	11	33,33
4	Máu	25	9,36	10	40,00	15	60,00
5	Dịch tai	14	5,24	7	50,00	7	50,00
6	Các loại dịch khác	8	2,99	6	75,00	2	25,00
7	Catheter	1	0,37	1	100,00	0	0,00
8	Nước tiểu	3	1,12	2	66,67	1	33,33
9	Dịch màng phổi	2	0,75	1	50,00	1	50,00
10	Dịch âm đạo	2	0,75	0	0,00	2	100,00
Tổng cộng		267	100,00	164	61,42	103	38,58

Các chủng *S. aureus* phân lập được chủ yếu từ bệnh phẩm mủ, dịch mũi, đám, máu còn ít ở các loại bệnh phẩm khác. Các chủng MRSA chiếm tỷ lệ cao (61,42%).

3.2. Mức độ đề kháng kháng sinh của MSSA và MRSA:

Bảng 3.2. Mức độ đề kháng kháng sinh của MRSA và MSSA

TT	Kháng sinh	MRSA		MSSA		p
		N thử	% R	N thử	% R	
1	Vancomycin	164	0,0	103	0,0	
2	Cefoxitin	164	100,0	103	0,0	<0,05
3	Gentamycin	151	45,1	95	31,6	<0,05
4	Amikacin	160	38,1	98	16,3	<0,05
5	Tetracyclin	161	65,2	99	16,2	<0,05
6	Trimethoprim-sulfamethoxazole	159	22,1	99	2,1	<0,05
7	Chloramphenicol	155	38,7	99	19,2	<0,05
8	Ciprofloxacin	161	44,1	102	36,3	
9	Clindamycin	151	85,4	93	47,3	<0,05
10	Erythromycin	163	88,3	96	57,3	<0,05

Với các vi khuẩn MRSA, sự đề kháng với các kháng sinh đều rất cao và cao hơn nhiều so với MSSA. Khi so sánh sự kháng thuốc ở các loại kháng sinh Amikacin, Ciprofloxacin, Gentamycin,

Tetracyclin, Trimethoprim-sulfamethoxazole, Chloramphenicol, Clindamycin và Erythromycin, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.3. Đánh giá các thử nghiệm phát hiện *Staphylococcus* kháng Methicillin:

Bảng 3.3. Kết quả các thử nghiệm phát hiện *Staphylococcus* kháng Methicillin

Vi khuẩn nuôi cấy	Kháng Oxacillin	Kháng Cefoxitin	Real-Time PCR			
			<i>mecA</i> + <i>nuc</i> +	<i>mecA</i> + <i>nuc</i> -	<i>mecA</i> - <i>nuc</i> +	<i>mecA</i> - <i>nuc</i> -
MRSA (35 chủng)	34	35	35	0	0	0
MSSA (30 chủng)	4	0	0	0	29	1

Trong 35 chủng MRSA, với thử nghiệm khuếch tán trên thạch bằng đĩa Oxacillin (1 μ g), có 1 trường hợp âm tính giả (2,9%). Ngược lại, trong 30 chủng MSSA, với thử nghiệm bằng đĩa Oxacillin, có 4 trường hợp dương tính giả (13,3%).

Bảng 3.4. Độ nhạy, độ đặc hiệu của kỹ thuật sử dụng đĩa Oxacillin phát hiện MRSA

PCR Oxacillin	Dương tính	Âm tính	Tổng số
Dương tính	34	4	38
Âm tính	1	26	27
Tổng số	35	30	65

Độ nhạy 97,14%, độ đặc hiệu 86,67%, giá trị dự báo dương tính 89,47%, giá trị dự báo âm tính 96,29%, độ phù hợp chẩn đoán 92,31%.

Bảng 3.5. Độ nhạy, độ đặc hiệu của kỹ thuật sử dụng đĩa Oxacillin phát hiện MRSA

PCR	Dương tính	Âm tính	Tổng số
Cefoxitin			
Dương tính	35	0	35
Âm tính	0	30	30
Tổng số	35	30	65

Độ nhạy 100,00%, độ đặc hiệu 100,00%, giá trị dự báo dương tính 100,00%, giá trị dự báo âm tính 100,00%, độ phù hợp chẩn đoán 100,00%.

4. BÀN LUẬN

4.1. Nhận xét chung về tính kháng Methicillin của *Staphylococcus aureus*

Trong 267 chủng *Staphylococcus aureus* chúng tôi phân lập được, các chủng *S. aureus* phân lập

được chủ yếu từ bệnh phẩm mũi, dịch mũi, đàm, máu còn ít ở các loại bệnh phẩm khác. Có 164 chủng kháng Methicillin (61,42%) và 103 chủng nhạy cảm Methicillin (38,58%). Phương pháp tầm soát *Staphylococcus* kháng Methicillin chúng tôi sử dụng là khuếch tán trên thạch với các khoanh giấy Oxacillin (1µg) và Cefoxitin (30 µg).

Trần Đỗ Hùng (2013) tại Bệnh viện đa khoa Trung ương Cần Thơ, ghi nhận tỷ lệ MRSA là 59,9% [3]. Phạm Hùng Vân (2005) nghiên cứu tình hình đề kháng kháng sinh của 235 chủng *S. aureus* từ 7 phòng thí nghiệm vi sinh của 7 bệnh viện ở Đà Nẵng, Cần Thơ và TPHCM, tỷ lệ MRSA là 47%. Theo tác giả, nếu dùng đĩa Cefoxitin thì khả năng tỷ lệ MRSA sẽ cao hơn [4].

Ở châu Á, Al-Baidani Abdul Rahman H. (2011) tại 3 bệnh viện tại thành phố Hodeidah, Yemen đã ghi nhận tỷ lệ MRSA là 48,3% (29/60 chủng *S. aureus*) [6]. Joshi Sangeeta (2013) nghiên cứu trên 26310 chủng *S. aureus* từ 15 trung tâm chăm sóc sức khỏe ở Ấn Độ (trong 2 năm 2008-2009), kết quả có 41% MRSA [12].

Tại châu Phi, Diab Manal (2008) đã ghi nhận tỷ lệ MRSA là 60% [10]. Orji I. (2012) ghi nhận tỷ lệ MRSA tại Bệnh viện trường Đại học Ebonyi, Nigeria là 77% với phương pháp được sử dụng là khuếch tán trên thạch với đĩa Oxacillin (10 µg) [14].

Với các nước châu Âu, mạng lưới Giám sát kháng kháng sinh của châu Âu (EARS) năm 2011 ghi nhận tỷ lệ chung của 28 quốc gia về MRSA là 16,7% (5703 MRSA/34.099 chủng *S. aureus*) [11].

Ở các nước thuộc châu Mỹ Latinh, tỷ lệ *Staphylococcus* cũng cao và thay đổi tùy theo quốc gia. Manuel Guzmán-Blanco đã ghi nhận tỷ lệ nhiễm khuẩn bệnh viện do MRSA vào năm 2006, ở Argentina là 51%, Bolivia 55%, Bra-xin 54%, Chile 29%...[13].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, mức độ đề kháng với các loại kháng sinh của MRSA đều cao hơn nhiều so với MSSA. Đối với Amikacin, Tetracyclin, Trimethoprim - sulfamethoxazole, Chloramphenicol, Clindamycin và Erythromycin, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Sự khác biệt này trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự với nhiều nghiên cứu của các tác giả khác ở trong nước và trên thế giới [1], [12].

Đối với Clindamycin và Erythromycin, tỷ lệ MRSA đề kháng của chúng tôi rất cao: 85,4 và 88,3%. Một số nghiên cứu cũng ghi nhận kết quả tương tự: Tỷ lệ kháng của *S. aureus* ở bệnh

viện Cần Thơ với Erythromycin ($n=46$) là 80,4%, kháng Clindamycin ($n=69$) là 76% [3], tác giả Phạm Hùng Vân (2005) ghi nhận tỷ lệ kháng Erythromycin của 235 chủng *S. aureus* là 63% [5].

Chúng tôi chưa phát hiện trường hợp nào của *S. aureus* đề kháng Vancomycin. Theo báo cáo của Bộ Y tế về sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh tại 15 bệnh viện Việt Nam (2008-2009), trong năm 2008 chỉ có bệnh viện Chợ Rẫy ghi nhận có 8% chủng *S. aureus* kháng Vancomycin. Tuy nhiên, đến năm 2009, phần lớn các bệnh viện kể cả bệnh viện Chợ Rẫy không có chủng nào kháng Vancomycin. Một số bệnh viện tỉnh và bệnh viện trực thuộc Sở y tế cho kết quả về tỷ lệ *S. aureus* kháng Vancomycin như: bệnh viện Ung Thư (60,9%), Bình Định (24,1%) và Xanh Pôn (Hà Nội) (15,6%) [1].

Với các nghiên cứu ở nước ngoài, nhiều tác giả cũng ghi nhận chưa có chủng *S. aureus* kháng Vancomycin: Al-Baidani Abdul Rahman H. (2011) tại Yemen [6]. Tuy nhiên, tác giả Orji I. (2012) ghi nhận tỷ lệ MRSA kháng Vancomycin rất cao tại Bệnh viện trường Đại học Ebonyi, Nigeria là 40% (20/50 chủng MRSA). Phương pháp được sử dụng trong nghiên cứu này là khuếch tán trên thạch với đĩa Vancomycin 30 µg [14].

4.2. Đánh giá các thử nghiệm phát hiện *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin:

Với phương pháp khuếch tán trên thạch với các đĩa Oxacillin 1µg và Cefoxitin 30 µg, chúng tôi chia 65 chủng *Staphylococcus* thành 2 nhóm: MRSA: 35 chủng, MSSA: 30 chủng. Thực hiện kỹ thuật Real Time PCR với 2 cặp mồi NUC 1 và 2, MEC 5 và 6 để tìm gen *mecA* và *nuc*. Kỹ thuật PCR tìm gen *mecA* được nhiều nghiên cứu xem là “Tiêu chuẩn vàng” khi chẩn đoán *S. aureus* kháng Methicillin (*mecA* +, *nuc* +) [2], [4], [8], [9], [15].

Đối với đĩa Oxacillin, có 4 chủng không có gen *mecA*/38 trường hợp ghi nhận kết quả kháng Methicillin (dương tính giả). Với 27 trường hợp ghi nhận âm tính, có 1 trường hợp là âm tính giả (*mecA* +). Như vậy, trong đánh giá *S. aureus* kháng Methicillin bằng đĩa Oxacillin của chúng tôi, độ nhạy 97,14%, độ đặc hiệu 86,67%, giá trị dự báo dương tính 89,47%, giá trị dự báo âm tính 96,29%, độ phù hợp chẩn đoán 92,31%.

Sử dụng đĩa Cefoxitin trong phát hiện *S. aureus* kháng Methicillin (65 chủng), kết quả cho thấy, tất cả 35 trường hợp ghi nhận dương tính và 30 trường hợp âm tính đều phù hợp với kết quả Real Time

PCR. Kỹ thuật này chúng tôi phối hợp thực hiện với Dr. Sylvain Godreuil, Khoa Vi sinh, CHU Arnaud de Villeneuve, Montpellier, Cộng hòa Pháp bởi vì kỹ thuật realtime PCR đa màu với SYBR green khá công phu và phức tạp, hiện tại chúng tôi chưa thực hiện được. Như vậy, trong đánh giá *S. aureus* kháng Methicillin bằng đĩa Cefoxitin của chúng tôi, độ nhạy và độ đặc hiệu là 100,00%, giá trị dự báo dương tính 100,00%, giá trị dự báo âm tính 100,00%, độ phù hợp chẩn đoán 100,00%.

So sánh 3 phương pháp pha loãng trên thạch 4% NaCl và 6 µg/mL Oxacillin, khoan giấy khuếch tán (với đĩa Cefoxitin 30µg, đĩa Oxacillin 1 µg) và PCR tìm gen *mecA*, Anand KB. [7] cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu của đĩa Cefoxitin đều là 100%. Độ nhạy và độ đặc hiệu của đĩa Oxacillin lần lượt là 87,5% và 100%. Đối với phương pháp pha loãng trên thạch, độ nhạy và độ đặc hiệu là 96,8% và 100%. Tác giả cho rằng việc sử dụng đĩa Oxacillin có thể không phát hiện được toàn bộ MRSA. Brown Derek F. J [8] khi mô tả nhiều phương pháp chẩn đoán MRSA đã cho rằng với phương pháp khuếch tán trên thạch, các vi khuẩn sản xuất lượng lớn penicillinase có thể làm nhỏ bớt đường kính vùng ức chế của đĩa Oxacillin, một số trường hợp cho thấy không có vùng ức chế (đường kính là 6mm), dẫn đến việc ghi nhận MRSA dương tính giả. Trong khi đó, Cefoxitin không bị ảnh hưởng bởi penicillinase, vì vậy độ đặc hiệu sẽ tốt hơn so với Oxacillin. Như vậy, phương pháp

sử dụng đĩa Cefoxitin 30 µg khuếch tán để phát hiện đề kháng Methicillin rất hiệu quả đối với *Staphylococcus aureus* (độ nhạy và độ đặc hiệu là 100%), đáng tin cậy để phát hiện *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin. Trong khi các kỹ thuật PCR phát hiện gen *mecA* còn khó thực hiện rộng rãi thì việc lựa chọn phương pháp sử dụng đĩa Cefoxitin 30 µg khuếch tán để phát hiện đề kháng Methicillin là khả thi và đáng tin cậy.

5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu 267 chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* gây nhiễm khuẩn bệnh viện phân lập tại khoa Vi sinh, Bệnh viện Trung ương Huế từ tháng 4 năm 2012 đến tháng 6 năm 2013, chúng tôi rút ra được một số kết luận sau:

1. Tỷ lệ phân lập *Staphylococcus aureus* cao nhất là được phân lập từ mẫu bệnh phẩm mủ 55,06%. Trong số 267 chủng *Staphylococcus aureus* phân lập được tại khoa Vi sinh, Bệnh viện Trung ương Huế tỷ lệ kháng Methicillin là 61,42%.

2. Mức độ đề kháng các kháng sinh của các chủng *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin cao và cao hơn nhiều so với các chủng nhạy cảm Methicillin.

3. Phương pháp khoan giấy khuếch tán sử dụng đĩa Cefoxitin 30 µg để phát hiện đề kháng Methicillin rất hiệu quả đối với *Staphylococcus aureus* (độ nhạy và độ đặc hiệu là 100%), đáng tin cậy để phát hiện *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2009), “Báo cáo sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh tại 15 bệnh viện Việt Nam năm 2008-2009”, Dự án Hợp tác toàn cầu về kháng kháng sinh GARP Việt Nam và Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng ĐH Oxford.
2. Trần Thu Hoa, Đỗ Thị Lan Hương, Nguyễn Thị Ngọc Loan, Hoàng Hiếu Ngọc, Phạm Hùng Vân (2009), “Nghiên cứu chế tạo bộ thử nghiệm multiplex PCR phát hiện *Staphylococcus aureus* đề kháng Methicillin”, *Y học TP Hồ Chí Minh*, Tập 13, Phụ bản số 2, tr. 176-180.
3. Trần Đỗ Hùng, Trần Thái Ngọc (2013), “Nghiên cứu sự đề kháng kháng sinh và sinh men β -lactamase phổ rộng của *S. aureus* được phân lập từ những bệnh phẩm tại bệnh viện đa khoa trung ương Cần Thơ”, *Y học thực hành* (869), Số 5, tr. 75-79.
4. Phạm Hùng Vân, Phạm Thái Bình (2005), “Tình hình đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *Staphylococcus aureus* - Kết quả nghiên cứu đa trung tâm thực hiện trên 235 chủng vi khuẩn”, *Y Học Thực Hành* ISSN 0866-7241, số 513, tr. 244-248.
5. Phạm Hùng Vân (2006), Kỹ thuật xét nghiệm vi sinh lâm sàng. Nhà xuất bản Y học.
6. Al-Baidani Abdul Rahman H., Wagih A. El-Shouny, Taha M. Shawa (2011), “Antibiotic susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in three hospitals at Hodeidah city, Yemen”, *Global Journal of Pharmacology*, Vol. 5 (2), p.106-111.
7. Anand KB. , P. Agrawal, S. Kumar, K. Kapila (2009), “Comparison of Cefoxitin diffusion disc test, Oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA”, *Indian Journal of Medical Microbiology*, Vol. 27, No.1, p. 27-9 .
8. Brown Derek F. J, David I. Edwards, Peter M. Hawkey, et al (2005), “Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus* (MRSA)", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 56, p. 1000-1018.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2007, 2011), *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement, M100-S21, Vol. 31, No. 1*.
 10. Diab Manal, Mervat El-Damarawy, Mouhamed Shemis (2008) "Rapid identification of Methicillin-resistant *Staphylococci* bacteremia among intensive care unit patients", *The Medscape Journal of Medicine*, Vol. 10 (5), p. 126.
 11. European Centre for Disease Prevention and Control (2012), "Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011", *Surveillance Report*, p. 55-58.
 12. Joshi Sangeeta, Pallab Ray, Vikas Manchanda (2013), "Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in India: Prevalence & susceptibility pattern", *Indian J Med Res*, Vol. 137, p. 363-369.
 13. Manuel Guzmán-Blanco, Carlos Mejía, Raul Isturiz et al. (2009), "Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America", *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 34, p. 304-308.
 14. Orji I., Nworie A., Eze U. A., Agberotimi I. O. (2012), "The prevalence and antimicrobial susceptibility profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens in a tertiary hospital, south east Nigeria", *Continental J. Pharmaceutical Sciences*, Vol. 6 (1), p. 23-29.
 15. Venkatakrishna Rao, Bhat Kishore, Kugaji Manohar, et al (2011), "Detection of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Comparison of disc diffusion and MIC with *mecA* gene detection by PCR", *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, Vol. 1, Issue 4, p. 518-521.