

NGHIÊN CỨU TÌNH TRẠNG ĐỀ KHÁNG KHÁNG SINH VÀ TỶ LỆ MANG GEN *mecA* CỦA CÁC CHÙNG *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Ở BỆNH NHÂN NHIỄM KHUẨN HUYẾT TẠI BỆNH VIỆN BỆNH NHIỆT ĐỐI TRUNG ƯƠNG VÀ BỆNH VIỆN QUÂN Y 103

Lê Văn Duyệt², Trần Viết Tiến¹, Phạm Văn Ca²,
Nguyễn Thị Thúy Hằng², Lê Văn Nam², Nguyễn Vũ Trung².

Mục tiêu: Mô tả tình trạng đề kháng kháng sinh và tỷ lệ mang gen *mecA* của *S. aureus*. **Đối tượng:** 43 chủng *S. aureus* được phân lập từ máu của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết điều trị tại Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương và Bệnh viện Quân y 103 trong thời gian từ 12/2012 - 6/2014. **Phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang. **Kết quả và kết luận:** Tình trạng kháng kháng sinh: 53,49% số chủng kháng *methicillin* (*MRSA*); Các chủng *S. aureus* kháng cao nhất với *penicillin* (100%), tiếp theo là nhóm *erythromycin* (65,12%) và *clindamycin* 60,47%. Nhóm *quinolon* còn nhạy khá cao: *ciprofloxacin* 83,72%; *levofloxacin* 86,05% và *moxifloxacin* 86,05%. Các kháng sinh còn nhạy cảm 100% là: *vancomycin*, *tigecycline*, *linezolid* và *quinupristin/dalfopristin*. So sánh 2 nhóm *MRSA* và *MSSA* thấy tỷ lệ nhóm *MRSA* kháng *levofloxacin*, *clindamycin*, *erythromycin*, *tetracycline ciprofloxacin*, *moxifloxacin* cao hơn các chủng *MSSA*, sự mang gen *mecA*; 23 chủng nhóm *MRSA* có 22 chủng (95,65%) mang gen *mecA*, còn 20 chủng nhóm *MSSA* chỉ gặp 3 chủng (15%) mang gen *mecA*.

Từ khóa: Kháng kháng sinh, *MRSA*, gen *mecA*.

ĐẶT VĂN ĐỀ

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) là nguyên nhân hàng đầu trong nhóm vi khuẩn Gram dương gây nhiễm khuẩn huyết. Nhiễm khuẩn huyết do *S. aureus* có bệnh cảnh thường rầm rộ, diễn biến phức tạp, điều trị khó khăn.Thêm vào đó, sự xuất hiện các chủng đề kháng methicillin và lan truyền rộng rãi các chủng này là nguyên nhân dẫn tới tình trạng đa kháng kháng sinh, gây khó khăn rất lớn cho công tác điều trị. Trong vài năm gần đây nhiều báo cáo cho thấy có trên 50% số chủng *S. aureus* đề kháng với methicillin^[1]. Hiện nay mặc dù có nhiều kháng sinh mới được đưa vào sử dụng trong điều trị bệnh

nhiễm trùng do *S. aureus*, tuy nhiên tỷ lệ tử vong vẫn ở mức cao từ 20 - 40%^[2].

Cơ chế kháng methicillin của *S. aureus* chủ yếu liên quan tới sự xuất hiện gen *mecA*, ngoài ra cũng có một số bằng chứng cho thấy sự xuất hiện của gen *femA*, *femB* cũng làm tăng khả năng đề kháng methicillin của tụ cầu vàng. Gen *mecA* chứa thông tin di truyền mã hóa cho phân tử protein PBP2a hay PBP2' (Penicillin Binding Protein có ái lực thấp với methicillin), đây là là enzyme có hoạt tính sinh tổng hợp thành tế bào vi khuẩn; vì vậy các chủng *S. aureus* có mang gen *mecA* (+) thường vẫn có khả năng sinh tổng hợp thành tế bào mà không chịu tác động út chẽ của thuốc kháng sinh.

Trên cơ sở đó, việc nghiên cứu tình trạng đề kháng kháng sinh liên quan tới tỷ lệ mang gen *mecA* của *S. aureus* là hết sức cần thiết, giúp cho chẩn đoán sớm và điều trị nhiễm trùng do *S. aureus* hiệu quả hơn. Do đó, chúng

¹Bệnh viện Quân y 103; ²Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương.

Ngày nhận bài: 10/10/2016.

Ngày phản biện xong: 05/12/2016.

Ngày duyệt đăng: 12/01/2017.

Người chịu trách nhiệm nội dung khoa học: Lê Văn Duyệt, Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương
Điện thoại: 0936647970 E-mail: duyettib@gmail.com

tôi tiến hành thực hiện đề tài nghiên cứu này nhằm mục tiêu: (1) Nghiên cứu tình trạng kháng kháng sinh của các chủng *S. aureus* trên bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết. (2) Tỷ lệ mang gen *mecA* của các chủng *S. aureus*.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu: Đối tượng nghiên cứu là 43 chủng *S. aureus*, được phân lập từ máu của bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết điều trị tại các khoa lâm sàng thuộc Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương và Bệnh viện Quân y 103 từ 12/2012 đến 6/2014.

Phương pháp: Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Quy trình nghiên cứu

- Kháng sinh đồ của các chủng vi khuẩn được thực hiện bằng cách xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) trên máy tự động Vitek 2 - Compact theo khuyến cáo của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm (CLSI) 2013 (Clinical and Laboratory Standards Institute -)^[3].

Xét nghiệm tìm gen *mecA*.

+ Vật liệu và quy trình tách chiết ADN: Sử dụng kit và quy trình của bộ kit QIAamp DNA Mini Kit (Mỹ).

+ Vật liệu tiến hành phản ứng PCR: PCR master mix (Invitrogen - Mỹ). Primer đặc hiệu cho một số gen liên quan^[5].

Primers phản ứng PCR

| Gen đích | Tên mồi | Trình tự nucleotide (5' - 3') | Kích thước (bp) | Vị trí gần |
|-------------|----------|-------------------------------|-----------------|-------------|
| <i>mecA</i> | Mec - A1 | AAAATCGATGGTAAAGGTGGC | 533 | 1282 - 1303 |
| | Mec - A2 | AGTTCTGCAGTACCGGATTGTC | | 1739 - 1814 |

Agarose dùng trong điện di.

Ethidium bromide dùng để nhuộm gel.

TAE (Tris Acetate EDTA).

PBS (Phosphate buffer Saline).

+ Thiết bị: Thiết bị lưu giữ chủng: Tủ lạnh -800; Máy so độ đặc Mc Faland; Máy điều nhiệt tự động (PCR) GenAmp PCR System 9700 AB (Applied Biosystems, Mỹ); Máy ly tâm lạnh; Bộ điện di ngang Horizon 58 (Gibco - BRL); Soi gel Wealtec Corp Model MD - 20 (Mỹ); Máy chụp ảnh gel Gel - doc (Biorad, Mỹ); Máy sequencing ABI PRISM 3130 (Mỹ).

+ Kỹ thuật PCR: Theo phương pháp của tác giả Kobayashi N, Wu H, Kojima K và cs^[5], hỗn hợp phản ứng

PCR gồm 200µl mỗi loại dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100pM mỗi cặp mồi, 1U Taq ADN polymerase, 10mM Tris - HCl, 1,5mM MgCl₂, 10µl ADN khuôn. Phản ứng được thực hiện với 25 chu kỳ. Mỗi chu kỳ gồm 3 bước: Biến tính (94°C/1 phút), gắn mồi (57°C/1 phút), tổng hợp chuỗi (72°C/1 phút). Sản phẩm PCR được điện di và chụp ảnh theo thường quy. Sản phẩm PCR được giải trình tự gen trực tiếp sử dụng cặp mồi PCR. Trình tự các sản phẩm PCR được so sánh với trình tự gốc trên ngân hàng gen (Gen-Bank) để khẳng định sản phẩm PCR là kết quả của phản ứng khuếch đại các gen *mecA*.

Thu thập và xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm Stata 10.0.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn

Bảng 1. Kết quả sàng lọc chủng *S. aureus* kháng methicillin

| Kết quả | Số chủng (n = 43) | Tỷ lệ (%) |
|---|-------------------|-----------|
| Kháng methicillin (<i>MRSA</i>) | 23 | 53,49 |
| Không kháng methicillin (<i>MSSA</i>) | 20 | 46,51 |

Có tới 53,49 % các chủng *S. aureus* kháng với methicillin, đây là nguyên nhân xảy ra tình trạng kháng kháng sinh phổ biến trên lâm sàng. Tỷ lệ này tương tự kết quả nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Minh Thư 53%^[2].

Bảng 2. Tình trạng đề kháng kháng sinh của *S. aureus*

| Kháng sinh | Ký hiệu | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | Mức độ đề kháng với kháng sinh theo MIC | | |
|-------------------------------|---------|-----------------------------|--|----------------|------------|
| | | | Nhạy (%) | Trung gian (%) | Kháng (%) |
| Penicillin | PEN | 0,03 - 0,5 | | | 43 (100) |
| Erythromycin | ERY | 0,25 - 8 | 15 (34,88) | | 28 (65,12) |
| Clindamycin | CM | 0,25 - 8 | 17 (39,53) | | 26 (60,47) |
| Tetracycline | TE | 1 - 16 | 19 (44,19) | | 24 (55,81) |
| Oxacillin | OXA | 2 - 4 | 20 (46,51) | | 23 (53) |
| Gentamycin | GM | 0,5 - 16 | 33 (76,74) | | 10 (23,26) |
| Trimethoprim/sulfamethoxazole | SXT | 10 - 320 | 33 (76,74) | | 10 (23,26) |
| Ciprofloxacin | CIP | 0,5 - 8 | 36 (83,72) | 1 (2,33) | 6 (13,95) |
| Levofloxacin | LVX | 0,12 - 8 | 37 (86,05) | | 6 (13,95) |
| Moxifloxacin | MXF | 0,25 - 8 | 37 (86,05) | 1 (2,33) | 5 (11,63) |
| Rifampin | RIF | 0,5 - 32 | 36 (83,72) | 5 (11,63) | 2 (4,65) |
| Vancomycin | VAN | 0,5 - 32 | 43 (100) | | |
| Quinupristin/dalfopristin | QD | 1 - 4 | 43 (100) | | |
| Linezolid | LZD | 4 - 8 | 43 (100) | | |
| Tigecycline | TGE | | 43 (100) | | |

Các kháng sinh bị kháng cao là: *penicillin* 100%; *erythromycin* 65,12%; *clindamycin* 60,47% và *tetracycline* 55,81%. Các kháng sinh còn nhạy cảm là: *vancomycin* 100%; *ciprofloxacin* 83,72%; *levofloxacin* 86,05%; *moxifloxacin* 86,05%. Những kháng sinh còn ít được sử dụng thì tỷ lệ còn nhạy cảm 100% là: *quinupristin/dalfopristin*, *linezolid* và *tigecycline*. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Thư^[2], trên 90% các chủng nhạy cảm với *moxifloxacin*, *rifampicin*; 100% số chủng nhạy cảm với *vancomycin*, *linezolid* và trên 80% số chủng đề kháng với *penicillin*, *clindamycin* và *erythromycin*.

Bảng 3. Tình trạng đề kháng kháng sinh của *S. aureus* nhóm MRSA và MSSA

| Kháng sinh | Ký hiệu | <i>S. aureus</i> nhóm MRSA | | | <i>S. aureus</i> nhóm MSSA | | |
|-------------------------------|---------|----------------------------|----------------|------------|----------------------------|----------------|-----------|
| | | Nhạy (%) | Trung gian (%) | Kháng (%) | Nhạy (%) | Trung gian (%) | Kháng (%) |
| Penicillin | PEN | | | 23 (100) | | | 20 (100) |
| Erythromycin | ERY | 4 (17,39) | | 19 (82,61) | 11 (55) | | 9 (45) |
| Clindamycin | CM | 3 (17,04) | | 20 (86,96) | 14 (70) | | 6 (30) |
| Tetracycline | TE | 6 (26,09) | | 17 (73,91) | 17 (65) | | 3 (35) |
| Gentamycin | GM | 16 (69,57) | | 7 (30,43) | 17 (85) | | 3 (15) |
| Trimethoprim/sulfamethoxazole | SXT | 17 (73,91) | | 6 (26,09) | 16 (80) | | 4 (20) |
| Ciprofloxacin | CIP | 18 (78,26) | 0 (0) | 5 (21,74) | 18 (90) | 1 (5,0) | 1 (5,0) |
| Levofloxacin | LVX | 18 (78,26) | | 5 (21,74) | 19 (95) | | 1 (5,0) |
| Moxifloxacin | MXF | 18 (78,26) | 1 (4,35) | 4 (17,39) | 19 (95) | 0 (0) | 1 (5,0) |
| Rifampin | RIF | 22 (95,65) | 0 (0) | 1 (4,35) | 14 (70) | 5 (25) | 1 (5) |
| Vancomycin | VAN | 23 (100) | | | 20 (100) | | |
| Quinupristin/dalfopristin | QD | 21 (100) | | | 22 (100) | | |
| Linezolid | LZD | 23 (100) | | | 20 (100) | | |

Cả 2 nhóm đều gặp kháng 100% với *penicillin*. Nhạy 100% với các kháng sinh: *vancomycin*, *linezolid*, *tigecycline*, *quinupristin/dalfopristin*. Các kháng sinh *clindamycin*, *erythromycin*, *tetracycline* cao hơn các chủng MSSA, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

Gen *mecA* của các chủng *S. aureus*

Bảng 4. Tỷ lệ mang gen *mecA* của *S. aureus* ở nhóm MRSA và MSSA

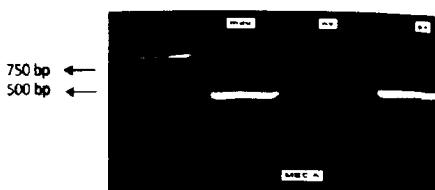
| Chủng | MRSA | | MSSA | |
|-----------------|------|-------|------|---|
| | Có | Không | Có | Không |
| Gen <i>mecA</i> | n | (%) | n | (%) |
| <i>mecA</i> | | | | Số chủng mang gen Mec A: 25 (58,14 %) |
| <i>mecA</i> | | | | Số chủng không mang gen Mec A: 18 (41,16 %) |

Số chủng không mang gen Mec A: 18 (41,16 %) như vậy gen *mecA* gặp ở hầu hết các chủng MRSA (95,65%) và chỉ gặp ở 15% ở nhóm MSSA. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Mohanasoundaram K.M và CS^[6] gặp 100% các chủng MRSA có gen *mecA* và chỉ có 1 chủng MSSA mang gen này. Kobayashi và CS^[5] nghiên cứu 198 chủng *S. aureus* gặp 156 chủng MRSA, cả 156 chủng này đều mang gen *mecA* và gặp 7/42 chủng MSSA có mang gen *mecA*.

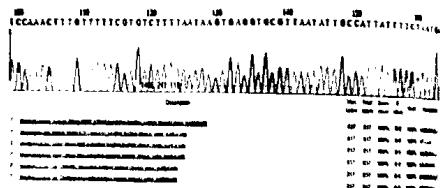
Bảng 5. Tình trạng đề kháng kháng sinh của nhóm *S. aureus* mang gen và không mang gen *mecA*

| Kháng sinh | Ký hiệu | Nhạy (%) | Trung gian (%) | Mang gen | Không mang gen | | |
|-------------------------------|---------|----------|----------------|-----------|----------------|----------------|-----------|
| | | | | Kháng (%) | Nhạy (%) | Trung gian (%) | Kháng (%) |
| Penicillin | PEN | | | 25 (100) | | | 18 (100) |
| Erythromycin | ERY | 5 (20) | | 20 (80) | 10 (55,56) | | 8 (44,44) |
| Clindamycin | CM | 5 (20) | | 20 (80) | 12 (66,67) | | 6 (33,33) |
| Tetracycline | TE | 8 (32) | | 17 (68) | 11 (61,11) | | 7 (38,89) |
| Oxacilllin | OXA | 3 (12) | | 22 (88) | 17 (94,44) | | 1 (5,56) |
| Gentamycin | GM | 18 (72) | | 7 (28) | 15 (83,33) | | 3 (16,67) |
| Trimethoprim/sulfamethoxazole | SXT | 19 (76) | | 6 (24) | 14 (77,78) | | 4 (22,22) |
| Ciprofloxacin | CIP | 20 (80) | | 5 (20) | 16 (88,89) | 1 (5,56) | 1 (5,56) |
| Levofloxacin | LVX | 20 (80) | | 5 (20) | 17 (94,44) | | 1 (5,56) |
| Moxifloxacin | MXF | 20 (80) | 1 (4) | 4 (16) | 17 (94,44) | 0 (0) | 1 (5,56) |
| Rifampin | RIF | 23 (92) | 1 (4) | 1 (4) | 13 (72,22) | 4 (22,22) | 1 (5,56) |
| Vancomycin | VAN | 25 (100) | | | 18 (100) | | |
| Quinupristin/dalfopristin | QD | 25 (100) | | | 18 (100) | | |
| Linezolid | LZD | 25 (100) | | | 18 (100) | | |
| Tigecycline | TGE | 25 (100) | | | 18 (100) | | |

Vancomycin và những kháng sinh mới đưa vào sử dụng như: *linezolid*, *tigecycline*, *quinupristin/dalfopristin* đang có tỷ lệ nhạy cảm 100%. Các kháng sinh *clindamycin*, *erythromycin*, *tetracycline* bị kháng với tỷ lệ cao; kháng sinh *ciprofloxacin*, *levofloxacin* và *moxifloxacin* bị kháng với tỷ lệ thấp hơn. Tuy nhiên tỷ lệ kháng các kháng sinh trên ở nhóm MRSA cao hơn hẳn so với nhóm MSSA, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, với $p < 0,05$. Tác giả Hidalgo M, Reyes J, (2008)^[4] thấy các chủng MRSA kháng tỷ lệ rất cao với nhóm *quinolone* 92,3% với *ciprofloxacin*; 91,8% với *levofloxacin* và 87,5% với *moxifloxacin*.



Hình 1. Kết quả PCR chủng *mecA*(+)



Hình 2. Giải trình tự gen *mecA* so với trình tự chuẩn trên GenBank

KẾT LUẬN

Tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn *S. aureus*

- Tỷ lệ chủng *S. aureus* kháng methicillin (MRSA) là: 53,49 %.

- Các kháng sinh bị kháng tỷ lệ cao là: *Penicillin 100%*; *erythromycin 65,12%*, *clindamycin 60,47%* và *tetracycline 55,81%*. Các kháng sinh còn nhạy 100% là: *vancomycin; quinupristin/dalfopristin, linezolid* và *tigecycline*; nhóm *quinolon: ciprofloxacin 83,72%*; *levofloxacin 86,05%*; *moxifloxacin 86,05%*.

- Tỷ lệ nhóm MRSA kháng với *clindamycin, erythro-*

mycin, tetracycline, ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin cao hơn các chủng *MSSA*, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, với $p < 0,05$.

Tỷ lệ mang gen kháng thuốc của vi khuẩn *S. aureus*

- Trong 43 chủng *S. aureus* có 25 chủng (58,14 %) mang gen *mecA*.

Nhóm *MRSA* có 23 chủng trong đó 22 chủng (95,65%) *mecA* (+); nhóm *MSSA* có 20 chủng thì chỉ gặp 3 chủng (15%) *mecA* (+).

*Số liệu trong đề tài là một phần kết quả nghiên cứu của Đề tài cấp nhà nước: "Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử xác định mức độ kháng kháng sinh của một số chủng vi khuẩn gây bệnh thường gặp ở Việt Nam giai đoạn 2012 - 2015".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế Việt Nam phối hợp với Dự án hợp tác toàn cầu về kháng kháng sinh GARP, Việt Nam và đơn vị Nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford, "Báo cáo sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh tại 15 bệnh viện Việt Nam năm 2008 - 2009", <http://www.cddep.org>.

2. Nguyễn Thị Minh Thư (2014), "Nghiên cứu mức độ đề kháng với kháng sinh và một số gen liên quan đến cơ chế kháng methicillin của *Staphylococcus aureus*", *Luận văn thạc sĩ y học*, Học viện Quân y.

3. CLSI Clinical Laboratory Standard Institute (2013), "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing", Twenty - third informational supplement. M100-S23. Vol. 33, No. 1.

4. Hidalgo M, Reyes J, (2008). "Resistance profiles to fluoroquinolones in clinical isolates of Gram positive cocci"

Biomedica. 2008 Jun; 28(2): 284 - 294.

5. Kobayashi N, Wu H, Kojima K, Taniguchi K, Urasawa S, Uehara N, Omizu Y, Kishi Y, Yagihashi A, Kurokawa I, (1994). "Detection of *mecA*, *femA* and *femB* genes in clinical strains of *Staphylococci* using polymerase chain reaction" Epidemiol Infect. 113 (2): 259 - 266.

6. Mohanasoundaram K.M, Lalitha M.K, (2008). "Comparison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*". Department Indian J Med Res 127, January 2008, 78 - 84.

7. Wylie DH, Crook DW, and Peto TE. (2006), "Mortality after *Staphylococcus aureus* bacteraemia in two hospitals in Oxfordshire, 1997 - 2003: cohort study", BMJ 2006: p. 281 - 333.

**ANTIBIOTIC RESISTANCE LEVEL AND *mecA* GENE OF
STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATED
FROM SEPTICEMIA PATIENTS IN NATIONAL HOSPITAL OF
TROPICAL DISEASES AND MILITARY HOSPITAL103**

Summary

Objectives: Determine the rate of antibiotic resistance and ratio of the *mecA* gene of *S. aureus* isolated from septicemia patients. **Subjects:** 43 *S. aureus* strains were isolated from septicemia patients in NHTD and Military hospital 103 during period of December, 2012 to June, 2014. **Methods:** Cross - sectional descriptive study (see again). **Results and conclusions:** Level of antibiotic resistance: 53.49 % MRSA strains; the highest resistance was to penicillin, accounting for 100%, followed by erythromycin (65.12%) and clindamycin 60.47%. quinolone group was highly sensitive: ciprofloxacin 83.72%; levofloxacin 86.05% and moxifloxacin 86.05%. Some anti-

otics were completely sensitive (100%), include: Vancomycin, tigecycline, linezolid, quinupristin/dalfopristin. By comparison of the antibiotic resistance between MRSA and MSSA group shown that: the rate resistance of MRSA group to clindamycin, erythromycin, tetracycline, levofloxacin, ciprofloxacin, moxifloxacin was higher than MSSA group, with $p < 0.05$. In addition, there were 25 *Staphylococcus aureus* strains (58.14 %) possessed *mecA* gene; and 22 of 23 MRSA strains (95.65%) showed to be having *mecA* gene; only 15% strains in MSSA group also possessed this gene.

Key words: Antibiotic resistance, MRSA, *mecA* gen.