

Phát hiện gen và đột biến kháng erythromycin ở các chủng *Streptococcus pneumoniae*

Lê Văn Duyệt^{1*}, Trần Thị Giáng Hương², Nguyễn Vũ Trung^{1,3}

¹Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương

²Bộ Y tế

³Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 17/3/2017; ngày chuyển phản biện 23/3/2017; ngày nhận phản biện 28/4/2017; ngày chấp nhận đăng 10/5/2017

Tóm tắt:

Streptococcus pneumoniae là căn nguyên thường gặp gây nhiễm trùng đường hô hấp cấp, đặc biệt ở trẻ em và người già. Erythromycin là kháng sinh được lựa chọn trong điều trị các trường hợp nhiễm trùng đường hô hấp cấp. Nghiên cứu nhằm phát hiện gen và đột biến liên quan đến kháng erythromycin ở các chủng *S. pneumoniae*. Kết quả cho thấy, sự xuất hiện gen *erm(A)*, gen *mef(A/E)*, gen *msr(D)* và đột biến trên vùng II thuộc gen *23S rRNA*, *23S rRNA* domain V1, V2, gen *L4 ribosome*. Các đột biến có liên quan đến mức độ kháng erythromycin của các chủng *S. pneumoniae*. Đây là nghiên cứu đầu tiên của Việt Nam về vấn đề này.

Từ khóa: Erythromycin, *Streptococcus pneumoniae*.

Chỉ số phân loại: 3.4

Detection of erythromycin-resistant genes and mutations in *Streptococcus pneumoniae*

Van Duyet Le^{1*}, Thi Giang Huong Tran²,
Vu Trung Nguyen^{1,3}

¹Tropical Disease Hospital Central

²Ministry of Health

³Hanoi Medical University

Received 17 March 2017; accepted 10 May 2017

Abstract:

Streptococcus pneumoniae is the common cause of acute respiratory infection, mainly in children and the older. Erythromycin is normally used for the treatment of this infection. The study aimed at detection of erythromycin-resistant genes and mutations in *S. pneumoniae* isolates. The results showed that *S. pneumoniae* isolates harbored *erm(A)*, *mef(A/E)*, and *msr(D)* genes and the resistant mutations in domain II of *23S rRNA* gene, domain V1-V2 of *23S rRNA* gene, and in *L4 ribosome* gene. The presence of the mutations were accordingly related to resistance level to erythromycin of *S. pneumoniae*. This was the first study of this issue in Vietnam.

Keywords: Erythromycin, *Streptococcus pneumoniae*.

Classification number: 3.4

Đặt vấn đề

Nhiễm trùng đường hô hấp cấp rất phổ biến tại các cơ sở y tế. Các căn nguyên ban đầu thường là virus như Rhinovirus, RSV, virus cúm và các căn nguyên khác (số liệu chưa công bố, Đơn vị Nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford - OUCRU, Hà Nội). Nhưng sau đó thường có bội nhiễm vi khuẩn. Căn nguyên vi khuẩn có thể gặp bao gồm *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, và *S. aureus*. Mới đây, thống kê từ UNICEF cho thấy, *S. pneumoniae* là nguyên nhân gây ra 50% các trường hợp tử vong do viêm phổi ở trẻ em trên toàn thế giới, đặc biệt ở các nước đang phát triển [1]. Theo một giám sát các trẻ nhập viện có liên quan đến căn nguyên *S. pneumoniae* tại tỉnh Khánh Hoà, Việt Nam (năm 2005-2006), tỷ lệ mắc viêm phổi xâm lấn là 48,7/100000 trẻ, 69% trẻ nhập viện vì viêm phổi do *S. pneumoniae*, 11% do viêm màng não do *S. pneumoniae*. Trong một nghiên cứu khác ở trẻ dưới 5 tuổi bị viêm đường hô hấp cấp tại Bệnh viện Saint Paul, Hà Nội năm 2003, vi khuẩn phân lập được với tỷ lệ cao nhất là *S. pneumoniae* (35,8%) [2]. Hiện tại, chưa có giám sát trên cộng đồng về viêm phổi xâm lấn và vẫn chưa có kế hoạch cho việc đưa vắc xin phòng *S. pneumoniae* vào Việt Nam sử dụng đại trà. Tỷ lệ nhiễm trùng xâm nhập do *S. pneumoniae* và *H. influenzae* đã giảm nhiều ở các nước phát triển kể từ khi vắc xin phòng *S. pneumoniae* và *H. influenzae* được đưa vào chương trình tiêm chủng của các nước này. Tuy nhiên, ở các nước đang phát triển, tỷ lệ nhiễm trùng do hai loài vi khuẩn này

*Tác giả liên hệ: Tel: 024.35764088

còn phổ biến và tình trạng các chủng vi khuẩn thuộc hai loài này đề kháng với các kháng sinh trong hướng dẫn điều trị ban đầu như penicillin ngày càng gia tăng.

Ở Nam Phi đã phát hiện tỷ lệ cao các chủng *S. pneumoniae* đề kháng trung gian với penicillin và đến hơn 45% chủng *H. influenzae* cũng đã đề kháng với penicillin. Ở khu vực châu Á, Việt Nam có tỷ lệ *S. pneumoniae* phân lập được trong năm 2000-2001 kháng penicillin cao nhất (71%) [3]. Thái Lan cũng có tỷ lệ *S. pneumoniae* đề kháng penicillin cao vào năm 2009 (81%) nhưng đã giảm đáng kể, còn 39% năm 2013 [4]. Trung Quốc có khoảng 15% các chủng *S. pneumoniae* không gây viêm màng não đề kháng với penicillin [5].

Các báo cáo thống kê tại các quốc gia châu Âu và Mỹ từ năm 1990 tới năm 2004 cho thấy, những chủng *S. pneumoniae* không nhạy cảm phân lập được từ bệnh phẩm đường hô hấp trên có tỷ lệ kháng trung gian là 7,8% (MIC 0,1-1 mg/l) và kháng hoàn toàn là 0,3% (MIC 2 mg/l). Trong khi đó, các chủng *S. pneumoniae* không nhạy cảm với penicillin phân lập từ những trường hợp nhiễm trùng huyết lại cao hơn với biểu hiện kháng trung gian từ 23-29% và kháng hoàn toàn là 6,7-10%. Tình trạng ở Anh và Ireland là 14,5% với kháng hoàn toàn và 18,5% với kháng trung gian [6]. Các báo cáo tương tự cũng chỉ ra rằng, tỷ lệ kháng của phế cầu với erythromycin là 29,3% ở Mỹ và 35,5% ở các nước châu Âu. Phần lớn các chủng kháng này (60%) mang gen *mef(A)* và một phần không nhỏ trong số đó (18,4%) kháng theo cơ chế của gen *erm(B)* [7].

Các nghiên cứu dịch tễ học ở Anh và Mỹ đã chỉ ra mối tương quan giữa việc tăng tỷ lệ *S. pneumoniae* kháng penicillin với tỷ lệ kê đơn thuốc kháng sinh nhóm betalactam. Điều đó cho thấy, việc sử dụng kháng sinh không hợp lý là một nguyên nhân dẫn tới tăng tỷ lệ kháng với penicillin ở *S. pneumoniae*. Tuy nhiên, tỷ lệ kháng của phế cầu với erythromycin ở Anh lại không giảm mặc dù việc sử dụng erythromycin giảm xuống. Trong khi đó, tỷ lệ kháng erythromycin của *S. pneumoniae* lại giảm xuống và nguyên nhân là do Mỹ đã áp dụng chiến dịch bao phủ vắc xin tái tổ hợp với 7 type (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F và 23F) cho trẻ em trên 2 tháng tuổi. Hiện tượng này có thể giải thích là do vắc xin đã bao phủ cả với những chủng có khả năng kháng erythromycin. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu đánh giá mức độ kháng kháng sinh của các chủng *S. pneumoniae* nhưng hầu như chưa có nghiên cứu nào phát hiện các gen và đột biến kháng thuốc tại các gen liên quan đến kháng erythromycin của vi khuẩn này.

Đối tượng, phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

26 chủng *S. pneumoniae*, trong đó có 23 chủng kháng erythromycin và 3 chủng nhạy với erythromycin (CLSI 2013). Các chủng này được phân lập và lưu giữ trong khuôn khổ đề tài cấp nhà nước mã số KC10.18/11-15: “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”, địa điểm nghiên cứu tại Labo Sinh học phân tử - Khoa Xét nghiệm - Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương và Khoa Vi sinh - Bệnh viện Bạch Mai.

Vật liệu

Vật liệu để bảo quản, lưu giữ chủng vi khuẩn: Môi trường canh thang BHI có 20% glycerol; ống cryotube vô trùng loại 2 ml; hộp trữ mẫu lạnh (loại 96 lỗ); đầu typ 200 µl, 1000 µl vô trùng; găng tay; khẩu trang.

Vật liệu để tách DNA tổng số của vi khuẩn: Ống eppendorf loại 2 ml; pipette; cốc thủy tinh; bút ghi kính; giấy thấm; dung dịch sát khuẩn; bộ tách DNA của hãng Qiagen (QIAmp DNA Mini Kit, Cat.No. 51304); găng tay; khẩu trang.

Vật liệu cho PCR: PCR master mix (Qiagen - Mỹ); agarose dùng trong điện di (Invitrogen - Mỹ); gel red dùng để nhuộm gel (Nimagen - Mỹ); TAE (Tris Acetate EDTA); PBS (Phosphate buffer saline).

Bảng 1. Bộ primer cho các gen liên quan đến đề kháng kháng sinh ở *S. pneumoniae* [8, 9].

Macroline (erythromycin)	23sRNA (Domain II)	rrl-F	CGG CGA TTA CGA TAT GAT GC
		rrl-R	CTC TAA TGT CGA CGC TAG CC
	V1-F	CTG TCT CAA CGA GAG ACT C	
		V1-R	GGA ACC ACC GGA TCA CTA AG
	23sRNA (Domain V)	V2-F	GTA TAA GGG AGC TTG ACT G
		V2-R	GGG TTT CAC ACT TAG ATG
	L22 (rpIV)	rpIV-F	GTC GAC GAC AAG AAA ACA CG
		rpIV-R	GCC GAC ACG CAT ACC AAT TG
	L4 (rpID)	rpID-F	CAA GTC AGG AGT TAA AGC TGC
		rpID-R	CAA CTT CGA AAG TGT ATT TGC C
	Erm(A)	Erm(A)F	CCCGAAAAATACGCAAAATTCAT
		Erm(A)R	CCCTGTTTACCCATTATATAACG
	Erm(B)	Erm(B)F	TGGTATTCCAAATGCGTAATG
		Erm(B)R	CTGTGGTATGGCGGGTAAGT
	Mef(A/E)	Mef(A/E)F	CAATATGGGAGGGCAAG
		Mef(A/E)R	AAGCTGTTCCAATGTCTACGG
	msr(D)	msr(D)F	TTGGACGAAGTAACCTCG
		msr(D)R	GCTTGGCTCTTACGTTT

Thiết bị nghiên cứu: Tủ lạnh -80°C (để lưu giữ chủng); máy so độ đục Mc Faland; máy điều nhiệt tự động GenAmp PCR System 9700 AB (Applied Biosystems, Mỹ); máy ly tâm lạnh Eppendorf (Mỹ); bộ điện di ngang Horizon 58(Gibco-BRL); soi gel Wealtec Corp Model MD-20 (Mỹ), máy chụp ảnh gel Geldoc (Biorad, Mỹ); máy sequencing ABI PRISM 3130 (Mỹ).

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả, thực nghiệm trong phòng xét nghiệm.

Kỹ thuật nghiên cứu: Kỹ thuật tách chiết DNA: Sử dụng bộ kit thương mại để tách chiết DNA tổng số theo quy trình của nhà sản xuất (bộ kit QIAamp DNA Mini Kit, Cat No. 51304); kỹ thuật PCR.

Thành phần phản ứng:

Thành phần	Thể tích (μl)
2x Master mix	
MgCl ₂ (25 mM)	25
DMSO	4
Primer F (***) (10 μM)	2
Primer R (***) (10 μM)	1
DNA khuôn	1
H ₂ O	2,5
Tổng thể tích phản ứng	50

Chu trình nhiệt:

Các bước	Nhiệt độ	Thời gian
Biến tính giai đoạn 1	94 °C	5 phút
Biến tính giai đoạn 2	94 °C	30 giây
Gắn mồi	*** °C	30 giây
Kéo dài	72 °C	1 phút
Kéo dài lần cuối	72 °C	5 phút

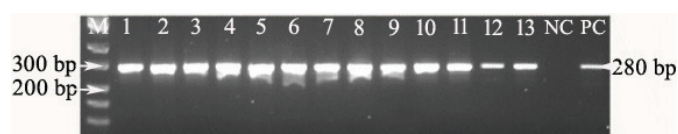
Các cặp mồi và nhiệt độ bắt cặp của gen đề kháng macrolide của *S. pneumoniae* [8, 9]: Sử dụng các cặp mồi đặc hiệu: *rrl*, *V1*, *V2*, *rp1V*, *rp1D*, *erm(A)*, *erm(B)*, *mef(A/E)*, *msr(D)*.

Mồi	<i>rrl</i>	<i>V1</i>	<i>V2</i>	<i>rp1V</i>	<i>rp1D</i>	<i>erm(A)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>mef(A/E)</i>	<i>msr(D)</i>
T [°]	58	58	58	55	55	62	62	62	62

Kết quả

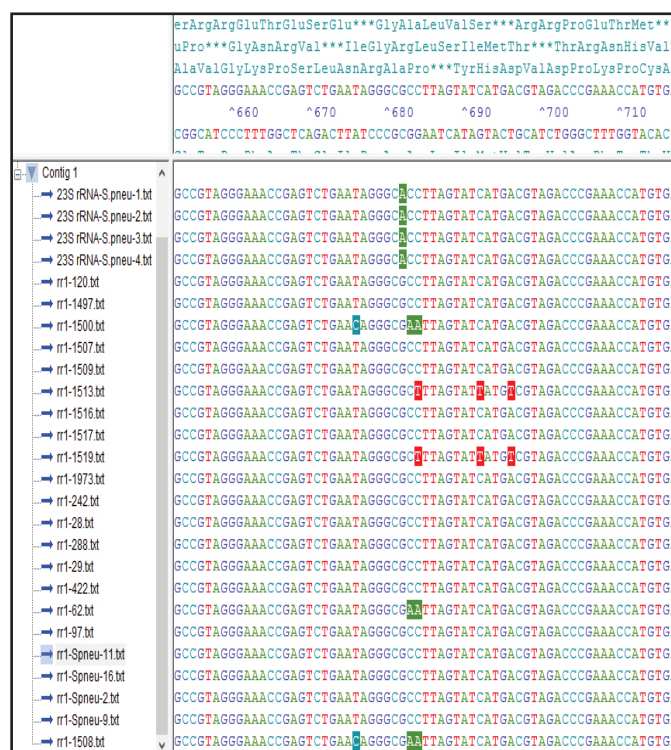
Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng V1 thuộc gen *23S rRNA* của *S. pneumoniae* được thể hiện ở hình 1. Trong đó, giếng M là thang DNA chuẩn, giếng từ 1 đến 13 là sản

phẩm PCR của các chủng *S. pneumoniae* có mã bệnh phẩm lần lượt là 28, 1973, 242, 288, 62, 97, 422, 1509, S.pneu-9, S.pneu-11, S.pneu-16, Spneu1, Spneu2, sản phẩm PCR có kích thước khoảng 450 bp. PC là chứng dương (Positive control), NC là chứng âm (Negative control).



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng V1 thuộc gen 23S rRNA của *S. pneumoniae*.

Kết quả phân tích kết quả đột biến trên vùng II thuộc gen *23S rRNA* được thể hiện ở hình 2. Trong đó, trình tự của các chủng *S. pneumoniae* trong nghiên cứu được so sánh với các trình tự gen *23S rRNA* chuẩn trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế (GenBank) NCBI, đột biến xuất hiện tại các vị trí nucleotide 675, 681, 684, 693, và 696 tương ứng với các codon 225, 227, 228, 231 và 232.



Bảng 2. Tỷ lệ các chủng *S. pneumoniae* mang gen đề kháng với macrolide (erythromycin).

Gen				
Tỷ lệ	<i>erm(A)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>mef(A/E)</i>	<i>msr(D)</i>
Có (n, %)	3 (12,5)	0 (0)	1 (4,2)	1 (4,2)
Không (n, %)	23 (87,5)	26 (100)	25 (95,8)	25 (95,8)
Tổng số (26)	26	26	26	26

Tỷ lệ các chủng *S. pneumoniae* mang đột biến gen 23S *rRNA* đề kháng macrolide (erythromycin), domain II được thể hiện ở bảng 3. Theo đó, tỷ lệ mang đột biến trên gen 23S *rRNA* domain II như sau: Có 2 chủng mang đột biến ở vị trí axit amin 225, 26 chủng mang đột biến ở vị trí 227, 5 chủng ở vị trí 228, 2 chủng ở vị trí 231 và 2 chủng ở vị trí 232.

Bảng 3. Tỷ lệ các chủng *S. pneumoniae* mang đột biến gen 23S *rRNA* đề kháng macrolide (erythromycin), domain II.

VTDB					
Tỷ lệ	225	227	228	231	232
Có (n, %)	2 (7,7)	26 (100)	5 (19,3)	2 (7,7)	2 (7,7)
Không (n, %)	24 (92,3)	0 (0)	21 (80,7)	24 (92,3)	24 (92,3)
Tổng số (26)	26	26	26	26	26

VTDB: Vị trí đột biến.

Tỷ lệ các chủng *S. pneumoniae* mang đột biến gen 23S *rRNA* đề kháng macrolide (erythromycin), domain V1 được thể hiện trong bảng 4. Theo đó, trên gen 23S *rRNA* domain V1 có 2 chủng mang đột biến tại vị trí axit amin 712, 1 chủng mang đột biến tại vị trí 713, 1 chủng ở vị trí 719, 2 chủng tại vị trí 722 và 2 chủng tại vị trí 735.

Bảng 4. Tỷ lệ các chủng *S. pneumoniae* mang đột biến gen 23S *rRNA* đề kháng macrolide (erythromycin), domain V1.

VTDB					
Tỷ lệ	712	713	719	722	735
Có (n, %)	2 (7,7)	1 (3,9)	1 (3,9)	2 (7,7)	2 (7,7)
Không (n, %)	24 (92,3)	25 (96,1)	25 (96,1)	24 (92,3)	24 (92,3)
Tổng số (26)	26	26	26	26	26

Tỷ lệ các chủng *S. pneumoniae* mang đột biến gen 23S *rRNA* đề kháng macrolide (erythromycin), domain V2 được thể hiện trong bảng 5. Theo đó, trên gen 23S *rRNA* domain V2 có tổng cộng 10 đột biến tại các vị trí axit amin 861, 867, 874, 876, 881, 882, 886, 887, 888, 889 tương ứng với số chủng là 3, 1, 2, 1, 1, 3, 2, 2, 5, 3.

Bảng 5. Tỷ lệ các chủng *S. pneumoniae* mang đột biến gen 23S *rRNA* đề kháng macrolide (erythromycin), domain V2.

VTDB									
Tỷ lệ	861	867	874	876	881	882	886	887	888
Có (n, %)	3 (11,5)	1 (3,9)	2 (7,7)	1 (3,9)	1 (3,9)	3 (11,5)	2 (7,7)	2 (7,7)	5 (19,2)
Không (n, %)	23 (88,5)	25 (96,1)	24 (92,3)	25 (96,1)	25 (96,1)	23 (88,5)	24 (92,3)	24 (92,3)	21 (80,8)
Tổng số (26)	26	26	26	26	26	26	26	26	26

Tỷ lệ các chủng *S. pneumoniae* mang đột biến gen L22 *ribosome* đề kháng macrolide được thể hiện trong bảng 6. Theo đó, không tìm thấy đột biến điểm trên gen L22 *ribosome* ở *S. pneumoniae*.

Bảng 6. Tỷ lệ các chủng *S. pneumoniae* mang đột biến gen L22 *ribosome* đề kháng macrolide (erythromycin).

VTDB	
Tỷ lệ	Đột biến
Có (n, %)	0 (0)
Không (n, %)	26 (100)
Tổng số (26)	26

Tỷ lệ các chủng *S. pneumoniae* mang đột biến gen L4 *ribosome* đề kháng macrolide được thể hiện trong bảng 7. Theo đó, có 1 chủng mang đột biến trên gen L4 *ribosome* tại các vị trí axit amin 38, 97, 98 và 101 tương ứng.

Bảng 7. Tỷ lệ các chủng *S. pneumoniae* mang đột biến gen L4 *ribosome* đề kháng macrolide (erythromycin).

VTDB (axit amin)				
Tỷ lệ	38	97	98	101
Có (n, %)	1 (3,9)	1 (3,9)	1 (3,9)	1 (3,9)
Không (n, %)	25 (96,1)	25 (96,1)	25 (96,1)	25 (96,1)
Tổng số (26)	26	26	26	26

Mối liên quan giữa tần suất mang gen các chủng *S. pneumoniae* với mức độ đề kháng erythromycin (macrolide) được thể hiện trong bảng 8. Theo đó, đối với các chủng *S. pneumoniae* đề kháng erythromycin, các chủng mang gen không có biểu hiện kiểu hình nhạy cảm với kháng sinh (tức là có giá trị MIC < 0,25 µg/ml). Tương tự như vậy, cũng không có chủng mang gen nào đề kháng trung gian với erythromycin (MIC: 0,25-<1 µg/ml). Trong khi đó, ở các chủng có biểu hiện đề kháng cho thấy cũng không có chủng nào đề kháng ở mức MIC: 1-2 µg/ml, có tới 3 chủng mang gen *erm(A)*, 1 chủng mang gen *mef(A/E)* và 1 chủng mang gen *msr(D)* là đề kháng với giá trị MIC > 2 µg/ml.

Bảng 8. Mối liên quan giữa tần suất mang gen các chủng *S. pneumoniae* với mức độ đề kháng erythromycin (macrolide) (n = 26).

Mức độ \ Gen	<i>erm(A)</i> (n)	<i>erm(B)</i> (n)	<i>mef(A/E)</i> (n)	<i>msr(D)</i> (n)
S (MIC < 0,25)	0	0	0	0
I (MIC: 0,25 - <1)	0	0	0	0
R (MIC: 1-2)	0	0	0	0
R (MIC > 2)	3	0	1	1
p	0,577		0,758	0,758
Tổng số	3	0	1	1

Mối liên quan giữa mức độ kháng erythromycin của *S. pneumoniae* với đột biến trên gen *23S rRNA*, domain II được thể hiện trong bảng 9. Theo đó, qua phân tích trình tự nucleotide của các chủng thấy xuất hiện 5 điểm đột biến tương ứng với các mức độ nhạy cảm với kháng sinh như sau: Toàn bộ các điểm đột biến ở vị trí 225 (2 chủng), 227 (26 chủng), 228 (5 chủng), 231 (2 chủng) và 232 (2 chủng) đều đề kháng rất cao với kháng sinh này (MIC > 2 µg/ml). Không tìm thấy chủng nào mang đột biến đề kháng trung gian (MIC: 0,25-<1) và đề kháng thấp (MIC: 1-2 µg/ml) với macrolide.

Bảng 9. Mối liên quan giữa mức độ kháng erythromycin của *S. pneumoniae* với đột biến trên gen *23S rRNA*, domain II (n = 26).

Mức độ \ Đột biến	Vị trí đột biến (axit amin)				
	225 (n, %)	227 (n, %)	228 (n, %)	231 (n, %)	232 (n, %)
S (MIC < 0,25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
I (MIC: 0,25 - < 1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
R (MIC: 1-2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
R (MIC > 2)	2 (8,7)	26 (100)	5 (21,8)	2 (8,7)	2 (8,7)
p	0,664	0,000	0,461	0,664	0,664
Tổng số	2	26	5	2	2

Mối liên quan giữa mức độ kháng erythromycin của *S. pneumoniae* với đột biến trên gen *23S rRNA*, domain V1 được thể hiện trong bảng 10. Theo đó, thấy xuất hiện 5 điểm đột biến, không thấy chủng nào mang đột biến nhạy cảm hoặc đề kháng trung gian hay đề kháng thấp

với macrolide. Toàn bộ các chủng mang đột biến đều đề kháng rất cao với kháng sinh, trong đó tại vị trí 712 có 2 chủng, 713 (1 chủng), 719 (1 chủng), 722 (2 chủng) và 735 (2 chủng).

Bảng 10. Mối liên quan giữa mức độ kháng erythromycin của *S. pneumoniae* với đột biến trên gen *23S rRNA*, domain V1 (n = 26).

Mức độ \ Đột biến	Vị trí đột biến (axit amin)				
	712 (n, %)	713 (n, %)	719 (n, %)	722 (n, %)	735 (n, %)
S (MIC < 0,25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
I (MIC: 0,25 - < 1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
R (MIC: 1 - 2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
R (MIC > 2)	2 (8,7)	1 (4,35)	1 (4,35)	2 (8,7)	2 (8,7)
p	0,664	0,763	0,763	0,664	0,664
Tổng số	2	1	1	2	2

Mối liên quan giữa mức độ kháng erythromycin của *S. pneumoniae* với đột biến trên gen *23S rRNA*, domain V2 được thể hiện trong bảng 11. Theo đó, trên gen *23S rRNA* domain V2 có 10 điểm đột biến, trong đó không có chủng nào mang đột biến nhạy cảm hay đề kháng trung gian hoặc đề kháng thấp với macrolide. Hầu hết các chủng mang đột biến đều đề kháng cao với kháng sinh, bao gồm các vị trí đột biến 861 (3 chủng), 867 (1 chủng), 874 (2 chủng), 876 (1 chủng), 881 (1 chủng), 882 (3 chủng), 886 (2 chủng), 887 (2 chủng), 888 (5 chủng), 889 (3 chủng).

Bảng 11. Mối liên quan giữa mức độ kháng erythromycin của *S. pneumoniae* với đột biến trên gen *23S rRNA*, domain V2 (n = 26).

Mức độ \ Đột biến	Vị trí đột biến (axit amin)									
	861 (n, %)	867 (n, %)	874 (n, %)	876 (n, %)	881 (n, %)	882 (n, %)	886 (n, %)	887 (n, %)	888 (n, %)	889 (n, %)
S (MIC < 0,25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
I (MIC: 0,25 - < 1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
R (MIC: 1 - 2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
R (MIC > 2)	3 (13,1)	1 (4,4)	2 (8,7)	1 (4,4)	1 (4,4)	3 (13,1)	2 (8,7)	2 (8,7)	5 (21,8)	3 (13,1)
p	0,586	0,763	0,664	0,763	0,763	0,586	0,664	0,664	0,461	0,586
Tổng số	3	1	2	1	1	3	2	2	5	3

Mối liên quan giữa mức độ kháng erythromycin của *S. pneumoniae* với đột biến trên gen *L4 ribosome* được thể hiện trong bảng 12. Theo đó, phân tích các đột biến của 4 chủng trên gen *L4 ribosome* với nồng độ MIC cho thấy, cả 4 chủng này đều đề kháng mức độ cao với erythromycin.

Bảng 12. Mối liên quan giữa mức độ kháng erythromycin của *S. pneumoniae* với đột biến trên gen *L4 ribosome* (n = 26).

Đột biến Mức độ	Vị trí đột biến (axit amin)			
	38 (n)	97 (n)	98 (n)	101 (n)
S (MIC ≤ 0,25)	0	0	0	0
I (MIC: 0,25 - <1)	0	0	0	0
R (MIC: 1 - 2)	0	0	0	0
R (MIC > 2)	1	1	1	1
p	0,664	0,763	0,763	0,664
Tổng số	1	1	1	1

Mối liên quan giữa mức độ kháng erythromycin của *S. pneumoniae* với các điểm đột biến trên gen *23S rRNA*, *L4* và *L22 ribosome* được thể hiện trong bảng 13. Theo đó, toàn bộ các chủng mang đột biến đều đề kháng, không có chủng đề kháng trung gian hay đề kháng thấp với kháng sinh này, duy chỉ có 2 chủng (5,5%) mang đột biến trên gen *23S rRNA* nhạy cảm với erythromycin. Trong khi đó có 24 chủng mang đột biến trên gen *23S rRNA*, 4 chủng mang đột biến trên gen *L4* có mức đề kháng rất cao với kháng sinh này.

Bảng 13. Mối liên quan giữa mức độ kháng erythromycin của *S. pneumoniae* với các điểm đột biến trên gen *23S rRNA*, *L4* và *L22 ribosome* (n = 26).

Đột biến Mức độ	Số điểm đột biến		
	<i>23S rRNA</i> (n, %)	<i>L4</i> (n, %)	<i>L22</i> (n, %)
S (MIC ≤ 0,25)	2 (5,5)	0 (0)	0 (0)
I (MIC: 0,25 - <1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
R (MIC: 1 - 2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
R (MIC > 2)	24 (94,5)	4 (100)	0 (0)
Tổng số	26	4	0

Bàn luận

S. pneumoniae là căn nguyên gây viêm phổi khá phổ biến trong cộng đồng, điều trị các nhiễm khuẩn này thường sử dụng phác đồ là các kháng sinh nhóm β -lactam và nhóm macrolide, tuy nhiên ngày càng ghi nhận được nhiều chủng đề kháng macrolide, đặc biệt là tại các nước Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam. Đề kháng macrolide thường liên quan đến hai cơ chế: Thứ nhất là methyl hóa phân tử *23S rRNA* bằng enzyme do gen *erm(A)*, *erm(B)* mã hóa; thứ hai là sử dụng hệ thống bơm chủ động macrolide do gen *mef(A)*, *msr(D)* mã hóa. Ngoài ra, cơ chế đề kháng macrolide do đột biến trên các protein ribosome (*L4* và *L22* protein) và trên phân tử *23S rRNA* cũng được ghi nhận có liên quan [9].

Với các cặp môi đặc hiệu cho các gen methyl hóa và bơm chủ động macrolide cho kết quả PCR dương tính chỉ với gen *erm(A)* (3/26 chủng), gen *mef(A/E)* (1/26 chủng), và *msr(D)* (1/26 chủng), không có chủng nào mang gen *erm(B)*. So với kết quả nghiên cứu của tác giả Jalava và cộng sự thực hiện tại Phần Lan năm 2004 không phát hiện được chủng nào có mang các gen này [8]. Việc tìm thấy các chủng *S. pneumoniae* có mang gen *erm(A)* và *mef(A)* rõ ràng cho thấy khả năng và cách thức đề kháng kháng sinh của vi khuẩn này đã có sự gia tăng và đa dạng hóa. Điều này làm cho vi khuẩn giảm dần nhạy cảm với kháng sinh điều trị và dễ dàng hình thành nên tính đa kháng thuốc. Thêm vào đó, kết quả phân tích kháng sinh đồ của các chủng này cũng cho kết quả tương đồng với tỷ lệ mang gen *erm* (giá trị MIC đều ở mức ≥ 2 μ g/ml đối với erythromycin), với 100% số chủng mang gen đều đề kháng hoàn toàn với erythromycin. Theo số liệu của tác giả Mosleh và cộng sự (2014) ghi nhận tỷ lệ mang gen *erm(B)* là 10,9%, *mef(A)* là 10,2% và tỷ lệ mang cả *erm(B)* + *mef(A)* là 7,3% [10]. Những chủng mang gen *erm(B)* và *mef(A)* đều đa kháng thuốc ở mức độ cao. Trong khi đó, nghiên cứu của tác giả Kumari và cộng sự (2008) tại Malaysia ghi nhận được 37 chủng trong tổng số 120 chủng mang gen *erm(B)* (30,8%), trong đó có tới 32 chủng đề kháng hoàn toàn và 5 chủng đề kháng trung gian với erythromycin [11]. Thêm vào đó không phát hiện được chủng nhạy cảm mang gen *erm(B)*. So sánh với các chủng *S. pneumoniae* đề kháng erythromycin ở Malaysia và nghiên cứu này thì thấy rằng đặc tính di truyền của loại

đề kháng này là rất khác biệt, đặc biệt là đối với tỷ lệ mang gen *erm(B)*. Tuy nhiên, việc phát hiện được các chủng *S. pneumoniae* mang các gen *erm(A)*, *mef(A)* và *msr(D)* cho thấy, đề kháng kháng sinh của loài vi khuẩn gây bệnh này đã và đang gia tăng về quy mô lẫn mức độ.

Với dạng đề kháng macrolide liên quan đến đột biến trên gen mã hóa protein ribosome và *23S rRNA*, chúng tôi đã thực hiện PCR thành công nhân dòng các gen này trong tất cả 26 chủng, sử dụng kỹ thuật giải trình tự nucleotide trên hệ thống máy sequencer của hãng ABI thu được nhiều đột biến có liên quan đến đề kháng macrolide (erythromycin). Nhiều số liệu nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng đề kháng macrolide là hệ quả của đột biến điểm trên các ribosome, bao gồm vùng II và V của *23S rRNA* và các protein ribosome *L4* và *L22* ở nhiều loài vi khuẩn, trong đó có *S. pneumoniae* [9]. Những protein ribosome này có cấu trúc phù hợp để sự tương tác trực tiếp với các macrolide, đột biến diễn ra trên vùng II và V của *23S rRNA* tại các vị trí C2611, G2057, A2058, A2059..., làm cho liên kết giữa kháng sinh và phân tử protein ribosome kém hiệu quả, dẫn đến mất hoạt lực và tạo đề kháng macrolide. Giải trình tự nucleotide của các vùng II, V1, và V2 trên phân tử *23S rRNA* của các chủng *S. pneumoniae* trong nghiên cứu này ghi nhận được nhiều điểm đột biến, đặc biệt là các đột biến trên vùng V như A2134C, A2157G, C2166T, T2572C, G2584C. Tiến hành phân tích, so sánh giá trị MIC và tỷ lệ mang đột biến của *S. pneumoniae*, kết quả cho thấy hầu hết các chủng này đều mang khả năng đề kháng rất cao với nhóm macrolide, không ghi nhận có chủng mang đột biến mà nhạy cảm với kháng sinh, điều này chứng minh rằng các điểm đột biến tìm thấy ở các chủng *S. pneumoniae* là có liên quan đến đề kháng kháng sinh. Tuy nhiên, theo nghiên cứu của B. Malbruny và cộng sự (2002), đột biến ghi nhận được trên vùng V của *23S rRNA* là tại vị trí C2611U, làm phá vỡ cấu trúc rRNA liên quan đến thay đổi vị trí không gian của vùng peptidyl transferase (vùng chứa A2058 và A2059) [9]. Đột biến C2611U cũng đã tìm thấy ở những chủng *E. coli* đề kháng erythromycin, và cả những chủng *S. pneumoniae* mang đột biến C2611A/G. Ở *S. pneumoniae* mang đột biến C2611 có thể làm tăng MIC của 14-15 loại kháng sinh macrolide, telithromycin, lincosamide và streptogramin B. Đột biến trên *L4* protein của *S. pneumoniae* và *S. pyogenes* là khá tương đồng, vùng đột

biến này nằm trên đoạn nối giữa hai α -helice ($\alpha 3$ và $\alpha 2$), có vai trò bám dính của phân tử protein vào *23S rRNA*. Chúng tôi không phát hiện được đột biến C2611 ở các chủng *S. pneumoniae* phân lập trong nghiên cứu này, tuy nhiên lại tìm thấy rất nhiều điểm đột biến mới ở cả trên vùng II, vùng V *23S rRNA*, *L4* và *L22* protein. Những đột biến này chưa từng được công bố và vì vậy vai trò của từng điểm đột biến với mức độ đề kháng kháng sinh hiện vẫn còn là một dấu hỏi, tuy nhiên so sánh nồng độ MIC và tỷ lệ mang đột biến của *S. pneumoniae* thì thấy rằng những chủng này đều kháng rất mạnh với erythromycin. Vì vậy, có thể sơ bộ khẳng định rằng phần lớn những đột biến ghi nhận được trên các chủng *S. pneumoniae* trong nghiên cứu này liên quan đến tính đề kháng kháng sinh macrolide (erythromycin). Trong thời gian tới, chúng tôi sẽ tiến hành thực hiện thêm các thí nghiệm về tạo đột biến điểm trên gen *23S rRNA*, *L4* và *L22* và sự ảnh hưởng của từng điểm đột biến đến mức độ kháng kháng sinh của vi khuẩn. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về vấn đề này. Kết quả của nghiên cứu cung cấp những thông tin quan trọng về cơ sở di truyền của kháng erythromycin của các chủng *S. pneumoniae*.

Kết luận

Đã phát hiện gen *erm(A)*, gen *mef(A/E)*, gen *msr(D)* và đột biến trên vùng II thuộc gen *23S rRNA*, *23S rRNA* domain V1, V2, gen *L4* ribosome. Các đột biến có liên quan đến mức độ kháng erythromycin của các chủng *S. pneumoniae*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.E. Roth, M.F. Gaffey, E. Smith-Romero, T. Fitzpatrick, S.K. Morris (2015), "Acute respiratory infection case definitions for young children: a systematic review of community-based epidemiologic studies in South Asia", *Trop. Med. Int. Health*, **20**(12), pp.1607-1620.
- [2] Bộ Y tế (2010), *Báo cáo sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh tại 15 bệnh viện Việt Nam từ 2008-2009*.
- [3] GARP: Vietnam National Working Group (2010).
- [4] NARST (2013), *Annual International conference*.
- [5] MOHNARIN (2011), *National investigation of bacterial drug resistance*.
- [6] D.J. Farrell, D. Felmingham, J. Shackcloth, L. Williams, K. Maher, R. Hope, D.M. Livermore, R.C. George, G. Brick, S. Martin, et al. (2008), "Non-susceptibility trends and serotype

distributions among *Streptococcus pneumoniae* from community-acquired respiratory tract infections and from bacteraemias in the UK and Ireland, 1999 to 2007", *J. Antimicrob. Chemother.*, **62**, Suppl. 2, pp.ii87-95.

[7] N. Woodford, P.R. Chadwick, D. Morrison, B.D. Cookson (1997), "Strains of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* can alter their van genotypes during an outbreak", *J. Clin. Microbiol.*, **35**(11), pp.2966-2968.

[8] J. Jalava, M. Vaara, P. Huovinen (2004), "Mutation at the position 2058 of the *23S rRNA* as a cause of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes*", *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, **3**, p.5.

[9] B. Malbruny, K. Nagai, M. Coquemont, B. Bozdogan, A.T.

Andrasevic, H. Hupkova, R. Leclercq, P.C. Appelbaum (2002), "Resistance to macrolides in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* due to ribosomal mutations", *J. Antimicrob. Chemother.*, **49**(6), pp.935-939.

[10] M.N. Mosleh, M. Gharibi, M.Y. Alikhani, M. Saidijam, F. Vakhshiteh (2014), "Antimicrobial susceptibility and analysis of macrolide resistance genes in *Streptococcus pneumoniae* isolated in Hamadan", *Iran J. Basic Med. Sci.*, **17**(8), pp.595-599.

[11] Navindra Kumari, Parasakthi Navaratnam, Shamala Devi Sekaran (2008), "Detection of *pbp2b* and *ermB* genes in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*", *J. Infect. Dev. Ctries.*, **2**(3), pp.193-199.