

XÁC ĐỊNH GEN MÃ HÓA EXFOLIATIVE TOXIN CỦA CÁC CHỦNG STAPHYLOCOCCUS AUREUS GÂY BONG VỠ DA TẠI BỆNH VIỆN DA LIỄU TRUNG ƯƠNG
PHẠM THỊ MAI HƯƠNG, NGUYỄN VŨ TRUNG, TRẦN LAN ANH, LÊ VĂN DUYỆT

TÓM TẮT

Để phát hiện nhanh các chủng *Staphylococcus aureus* gây bệnh bong vảy da trên người, kỹ thuật PCR với cặp mồi được thiết kế để nhận đặc hiệu cho gen mã hóa (*eta*, *etb*) ngoại độc tố exfoliative toxin (ETA, ETB). DNA khuôn dùng trong phản ứng PCR được tách chiết từ 24 chủng vi khuẩn *S. aureus* phân lập từ bệnh nhân bị hội chứng bong vảy da tại Bệnh viện Da liễu Trung ương. Kết quả cho thấy, 24 chủng này đều mang cả hai gen mã hóa cho độc tố ETA và ETB. Tỷ lệ mang gen *eta* và *etb* của các chủng gây bệnh trên bệnh nhân nữ cao gấp 1,5 lần so với nam, ngoài ra có tới hơn 83% bệnh nhân mắc bệnh có độ tuổi <3. Trình tự nucleotid của đoạn gen mã hóa ETA và ETB của các chủng *S. aureus* trong nghiên cứu này tương đồng 100% với với các trình tự gen đã công bố trên ngân hàng gen quốc tế.

Từ khóa: Ngoại độc tố, Enzyme protease, ETA, ETB

SUMMARY

For rapid detection of *Staphylococcus aureus* causing Staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS), a PCR test with primers was applied specific to genes encoding exfoliative toxins (ETA and ETB). DNA template used in the PCR reaction was extracted from 24 strains of *S. aureus* isolated from patients with SSSS admitted to the National Hospital of Dermatology and Venereology. Results of PCR showed that all strains have both genes coding for toxins ETA and ETB. The rate of having the gene in female patients was 1.5 times higher than men. In addition, more than 83% of patients aged <3 were seen. Sequencing results showed the nucleotide sequences of the genes coding for ETA and ETB were 100% similar to those in the international gene bank.

Keywords: Exotoxin, ETA, ETB, gene.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng bong vảy da do tụ cầu (*Staphylococcal scalded skin syndrome -SSSS*) lần đầu tiên được Baron Gottfried Ritter Von Ritterstain mô tả năm 1878[1]. Tuy nhiên, vai trò của độc tố đến 1970 mới được Melish và Glasgow chứng minh [2]. Bệnh biểu hiện ở mọi lứa tuổi đặc biệt là ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Các biểu hiện gồm ban đỏ dạng tinh hồng nhiệt xung quanh các hốc tự nhiên, trên đó nhanh chóng hình thành các bong nước rất nông, sau liên kết thành mảng bong nước lan rộng. Sau 24-48h bong nước vỡ, vảy da ở rìa bong nước cuộn lại quấn mép như cuộn thuốc lá. Bong nước vỡ sẽ làm mất đi phần lớn lớp da ngoài của người bệnh [3]. Bệnh khởi phát khi cơ thể bị nhiễm *S. aureus* tại các vị trí xây xước và gây nên các ổ nhiễm trùng, tại đó vi khuẩn tiết ra các ngoại độc tố ETA và ETB [4]. Ngoại độc tố này bám vào các thụ thể TCR (T Cell Receptor) và MHC (Major Histocompatibility Complex) trên các tế bào miễn dịch và giúp chúng di chuyển đến vùng da tổn thương [3]. Tại đây, chúng phân cắt các protein desmoglein

(protein liên kết các tế bào da) tách lớp sừng rời khỏi lớp hạt gây nên các bong nước [5].

S. aureus tạo ra ít nhất bốn loại exfoliative toxin, trong số đó ETA và ETB chủ yếu gây bệnh SSSS trên người [6]. ETA là một protein được cấu tạo từ 242 axit amin, có kích thước phân tử xấp xỉ 27 kilo Dalton (kDa), gen mã hóa cho ETA thường nằm trên nhiễm sắc thể của *S. aureus*. Ngược lại, gen mã hóa ETB thường nằm trên plasmid. Phân tích cấu trúc tinh thể của ETA và ETB cho thấy, cả hai protein đều có cấu trúc khá tương đồng, bao gồm hai vùng chuyên biệt S1 và S2, mỗi vùng chứa sáu chuỗi Beta – sheet và một vùng C-terminal Alpha – helix. Sự giống nhau về mặt cấu trúc cũng phần nào phản ánh đúng mức độ tương đồng cao về trình tự axit amin giữa hai gen *eta* và *etb* [7].

Theo nhiều nghiên cứu, có sự khác biệt về tỷ lệ phân bố gen *eta* và *etb* ở các chủng *S. aureus* gây bệnh trên thế giới. Ở châu Âu, Mỹ và châu Phi, *eta* xuất hiện phổ biến ở hơn 80% các chủng *S. aureus* [4]. Tuy nhiên ở Nhật Bản, các chủng mang gen *etb* xuất hiện phổ biến hơn. Ngoài ra, một số chủng *S. aureus* phân lập tại các vùng tổn thương mang cả hai gen mã hóa cho độc tố này. Điều đó chứng tỏ rằng các chủng này có độc lực cao và tạo ra nhiều tổn thương trên lâm sàng.

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về hội chứng SSSS do *S. aureus* vẫn chỉ dừng lại ở mức độ lâm sàng, chưa có các nghiên cứu về gen mã hóa độc tố exfoliative toxin. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm mục tiêu: Xác định sự có mặt và phân bố gen *eta* và *etb* ở các chủng *S. aureus* phân lập được từ bệnh nhân bị hội chứng bong vảy da.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng

Các bệnh nhân có triệu chứng của Hội chứng bong vảy da.

24 chủng *S. aureus* phân lập từ bệnh nhân bị mắc Hội chứng bong vảy da điều trị nội trú tại Bệnh viện Da liễu Trung ương.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân:

- Bệnh khởi phát cấp tính dạng ban đỏ tinh hồng nhiệt ở mặt, cổ, và các nếp gấp. Sau 24-48h, trên dát đỏ nhanh chóng xuất hiện bong nước nông, mềm, sau trợt ra thành đám trợt ướt, bong vảy da mỏng quấn như giấy cuộn thuốc lá, có thể Nikolsky (+).

- Nuôi cấy dịch thương tổn da hoặc dịch ngoáy mũi có tụ cầu vàng.

* Tiêu chuẩn loại trừ: Các bệnh phát ban do virus, dị ứng thuốc; bệnh da bong nước khác như chốc, viêm da tiếp xúc côn trùng... Bệnh nhân, cha/mẹ hoặc người bảo trợ không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Phân lập chủng *Staphylococcus aureus*

Bệnh phẩm mủ tại vùng da tổn thương và dịch ngoáy mũi được cấy trên môi trường thạch máu, ở

nhiệt độ 35°C trong 18-24h. *S.aureus* được xác định theo thường qui vi sinh lâm sàng.

2.3 Tách chiết ADN của *S. aureus*

Quy trình tách chiết ADN được thực hiện theo mô tả trước đây [8], vi khuẩn được trộn đều với 300µl lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM Na₂EDTA, 0.5 M NaCl, 10% SDS) và ủ ở nhiệt độ 70°C trong 10 phút. Protein được loại bỏ bằng hỗn hợp dung dịch Phenol:Chloroform:Iso-amyl alcohol (25:24:1). ADN được rửa bằng 1v/1v dung dịch Isopropanol và ly tâm ở tốc độ 13,000 vòng/phút trong 15 phút. Cặn ADN được rửa lại bằng 500µl Ethanol 70% và làm khô ở nhiệt độ phòng, sau đó hòa lại trong 50µl H₂O hoặc TAE buffer.

2.4 Phản ứng chuỗi (PCR)

Hỗn hợp phản ứng PCR bao gồm 12,5µl 2X KAPA2G Robust HotStart ReadyMix, 0,5µM Forward primer, 0,5µM Reverse primer, 5% DMSO, 50 ng ADN tổng số, dẫn H₂O tới tổng thể tích phản ứng là 25µl. Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt như sau: biến tính 95°C 15 phút, 35 chu kỳ 95°C 1 phút, 57°C - 30 giây, 72°C - 30 giây, kết thúc 72°C 10 phút [8].

et Forward: 5 – GCA GGT GTT GAT TTA GCA TT
a –3
Reverse: 5 – AGA TGT CCC TAT TTT TGC TG
–3
et Forward: 5 – ACA AGC AAA AGA ATA CAG CG
b –3
Reverse: 5 – GTT TTT GGC TGC TTC TCT TG
–3

2.5. Điện di trên gel agarose

8µl sản phẩm PCR được trộn đều với 2µl 5x loading dye buffer, sau đó chuyển vào giếng trên gel agarose 2% đã được bổ sung 1x TAE buffer. Bước điện di được thực hiện như sau: hiệu điện thế 100 Volts, thời gian là 30 phút. Sau khi kết thúc điện di, gel được nhuộm với Ethidium bromide trong 5 phút và đọc kết quả bằng tia UV.

2.6. Giải trình tự gen

Hỗn hợp phản ứng sequencing được chuẩn bị như sau: 4µl Bigdye sequencing buffer, 2µl Ready reaction premix, 3,2 pmol Forward primer (hoặc Reverse primer), 5 ng ADN template, dẫn H₂O tới tổng thể tích là 20µl. Phản ứng PCR sequencing được thực hiện theo chu trình nhiệt như sau: 95°C 1 phút, 25 chu kỳ 95°C - 10 giây, 50°C - 10 giây, 60°C - 4 phút. Sản phẩm sau đó được tinh sạch bằng bộ kit ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ của hãng Zymo research, đọc trên máy giải trình tự gen 3130 của hãng

3. Kết quả giải trình tự.

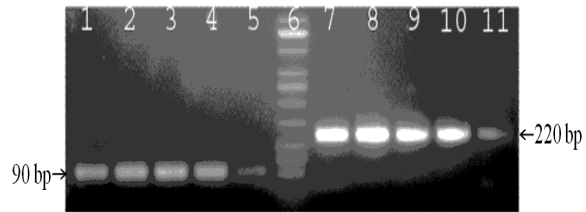
So sánh trình tự của đoạn gen *eta* và *etb* của 24 chủng *S.aureus* với các trình tự trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế (National Centre for Biotechnology Information - NCBI cho thấy độ tương đồng 100% với các chủng *S.aureus* phân lập tại Mỹ, và Nhật Bản (Hình 2).

AppliBiosystem. Trình tự ADN thu nhận và phân tích trên phần mềm sequencing analysis v5.4.

KẾT QUẢ

1. Kết quả PCR.

Tất cả 24 chủng *S. aureus* đều có sản phẩm có kích thước khoảng 90 bp đối với gen *eta* và khoảng 220 bp đối với gen *etb*. [hình 1].



Hình 1: Kết quả PCR phát hiện gen *eta* và *etb* của 5 chủng *S. aureus*. Thang ADN chuẩn (giếng số 6). Từ 1 đến 5 là sản phẩm PCR của gen *eta* có kích thước khoảng 90 bp. Từ giếng số 7 đến số 11 là sản phẩm PCR của gen *etb* có kích thước khoảng 220 bp

2. Phân bố gen *eta* và *etb*

Có 7/24 chủng phân lập được tại mũi và 17/24 chủng phân lập tại vị trí da tổn thương

Bảng 1: Phân bố gen *eta* và *etb* ở 24 chủng *S. aureus*.

Stt	Vị trí lấy mẫu	ETA	ETB	Stt	Vị trí lấy mẫu	ETA	ETB
1	Mũi	+	+	13	Tổn thương	+	+
2	Mũi	+	+	14	Tổn thương	+	+
3	Mũi	+	+	15	Mũi	+	+
4	Tổn thương	+	+	16	Tổn thương	+	+
5	Tổn thương	+	+	17	Tổn thương	+	+
6	Tổn thương	+	+	18	Tổn thương	+	+
7	Tổn thương	+	+	19	Mũi	+	+
8	Mũi	+	+	20	Mũi	+	+
9	Tổn thương	+	+	21	Tổn thương	+	+
10	Tổn thương	+	+	22	Tổn thương	+	+
11	Tổn thương	+	+	23	Tổn thương	+	+
12	Tổn thương	+	+	24	Tổn thương	+	+

Theo bảng trên, các chủng *S. aureus* phân lập được ở vùng tổn thương và niêm mạc mũi ở bệnh nhân mắc hội chứng bong vảy da.

```

      10      20      30      40      50      60
VN S.aureus ETB      TTCCACCTACAGATAAAGAGCTTTATACACACATTACGGATAATGCAAGAAGTCCTTATA
S. aureus SAP057A, ETB TTCCACCTACAGATAAAGAGCTTTATACACACATTACGGATAATGCAAGAAGTCCTTATA
S. aureus TY4, ETB   TTCCACCTACAGATAAAGAGCTTTATACACACATTACGGATAATGCAAGAAGTCCTTATA
S.aureus ETB        TTCCACCTACAGATAAAGAGCTTTATACACACATTACGGATAATGCAAGAAGTCCTTATA

      70      80      90      100     110     120
VN S.aureus ETB      ATTCTGTTGGTACAGTGTGTTGTCAAAGGTAGTACATTAGCTACCGGAGTTTTAAATTGGTA
S. aureus SAP057A, ETB ATTCTGTTGGTACAGTGTGTTGTCAAAGGTAGTACATTAGCTACCGGAGTTTTAAATTGGTA
S. aureus TY4, ETB   ATTCTGTTGGTACAGTGTGTTGTCAAAGGTAGTACATTAGCTACCGGAGTTTTAAATTGGTA
S.aureus ETB        ATTCTGTTGGTACAGTGTGTTGTCAAAGGTAGTACATTAGCTACCGGAGTTTTAAATTGGTA

      130     140     150     160
VN S.aureus ETB      AAAATACAATTGTTACTAATTACCACGTTGCAAGAGAAGCAGCCAAAAA
S. aureus SAP057A, ETB AAAATACAATTGTTACTAATTACCACGTTGCAAGAGAAGCAGCCAAAAA
S. aureus TY4, ETB   AAAATACAATTGTTACTAATTACCACGTTGCAAGAGAAGCAGCCAAAAA
S.aureus ETB        AAAATACAATTGTTACTAATTACCACGTTGCAAGAGAAGCAGCCAAAAA

```

Hình 2: So sánh trình tự nucleotide gen *etb* của chủng *S. aureus* phân lập tại Việt Nam (ký hiệu: VN *S. aureus* ETB) và các chủng *S. aureus* SAP057A phân lập tại Mỹ, *S. aureus* TY4 phân lập ở Nhật Bản, *S. aureus* ETB phân lập tại Mỹ

4. Phân bố tuổi và giới.

Tuổi mắc bệnh trung bình là 2,75; trong đó, bệnh nhân lớn tuổi nhất là 14 và nhỏ tuổi nhất là 1, hầu hết các bệnh nhân đều có độ tuổi < 6. Trẻ < 3 tuổi chiếm tới 83% trong tổng số 24 bệnh nhân. Kết quả trong nghiên cứu này cũng cho thấy tỷ lệ nam/nữ là 1,5.

BÀN LUẬN

1. Phân bố gen *eta* và *etb* ở các chủng *S.aureus* gây bệnh.

Việc có mặt cả hai gen mã hóa cho ETA và ETB cho thấy độc lực của các chủng *S. aureus* gây bệnh tại Việt Nam là rất cao. Sự xuất hiện đồng thời cả hai gen mã hóa độc tố exfoliative toxin trên tất cả 24 chủng *S. aureus* gây bệnh trên người tại Việt Nam phân lập từ tháng 3 năm 2011 đến tháng 3 năm 2012 cho thấy vai trò gây bệnh của các chủng vi khuẩn này.

Theo Ladhani, chỉ có 31% trường hợp dương tính với exfoliative toxin và 69% không cho thấy có sự tồn tại của độc tố. Nghiên cứu tại Vương quốc Anh và Ai-sơ-len thấy, 32% số chủng chỉ mang gen *eta*, 12% mang gen *etb* và 27% mang cả hai gen [9]. Ngoài ra, các số liệu nghiên cứu tại Đức, Pháp và Mỹ cũng cho kết quả tương tự [1]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi có sự khác biệt khá rõ rệt về tỷ lệ mang gen độc tố giữa các chủng *S.aureus* gây bệnh ở Việt Nam với một số nước khác. Điều này có thể do đặc thù phân bố loại vi khuẩn này tại các vùng địa lý, đặc điểm phân bố trên các đối tượng bệnh nhân có thể khác nhau.

2. Phân bố gen *eta* và *etb* với tuổi và giới tính.

Tỷ lệ bệnh nhân bị mắc SSSS do *S. aureus* có độ

tuổi <3 chiếm 83%, điều đó có thể khiến các bệnh nhân nhỏ tuổi thường có khả năng bị SSSS cao so với lứa tuổi lớn. Nghiên cứu của Ladhani cho thấy, tỷ lệ bệnh nhân có kháng thể kháng ETA, ETB ở trẻ có độ tuổi từ 3 đến 24 tháng là 30%, sau đó tăng lên 50% ở trẻ 10 tuổi và 91% ở độ tuổi trên 40 [10]. Một nghiên cứu khác cũng cho kết quả tương tự với 78% các bệnh nhân có vấn đề về sức khỏe và bị suy yếu hệ miễn dịch đều có tỷ lệ mang kháng thể kháng exfoliative toxin thấp [4]. Điều này có thể được giải thích rằng, bệnh nhân càng nhỏ tuổi thì hệ miễn dịch chưa phát triển và chưa đủ khả năng sinh kháng thể kháng lại exfoliative toxin và do vậy nguy cơ mắc bệnh cao hơn so với các lứa tuổi khác khiến tỷ lệ phân lập được vi khuẩn thường cao ở lứa tuổi này nhưng tỷ lệ phát hiện kháng thể lại thấp.

Khi xem xét yếu tố giới tính, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, tỷ lệ các chủng *S. aureus* mang gen *eta* và *etb* trên đối tượng bệnh nhân là nữ cao gấp 1,5 lần so với nam. Theo nghiên cứu của Cribier năm 1994 tại Pháp, trong số 32 trường hợp SSSS tỷ lệ nam chiếm 66% (21 trường hợp) [11]. Kết quả trong nghiên cứu của chúng tôi có sự chênh lệch rất lớn so với nghiên cứu của Cribier, tuy nhiên, sự khác biệt này có thể là do cỡ mẫu trong nghiên cứu của chúng tôi nhỏ hơn nên chưa thể đánh giá đầy đủ được tỷ lệ nam/nữ. Ngoài ra sự khác nhau ở thời điểm, vị trí địa lý và đặc điểm sinh học của đối tượng khi thực hiện nghiên cứu cũng có thể là nguyên nhân dẫn đến sự chênh lệch về kết quả

3. Mối liên quan giữa các chỉ số xét nghiệm và sự xuất hiện gen *eta* và *etb* ở các chủng *S. aureus* phân lập từ bệnh nhân.

Qua phân tích các chỉ số xét nghiệm như Công thức máu, chức năng gan, điện giải, sinh hóa nước tiểu của các bệnh nhân SSSS mang chủng *S. aureus*, chúng tôi không thấy có sự thay đổi bệnh lý nào có ý

ngĩa thống kê. Theo chúng tôi, điều này còn phụ thuộc vào tình trạng chung của cơ thể, đặc biệt là vai trò gây nhiễm trùng của các chủng *S. aureus* mang gen *eta* và *etb*. Theo một số nghiên cứu, có thể chủng *S. aureus* sinh độc tố và gây ra các tổn thương tại chỗ nhưng không gây nhiễm trùng toàn thân, đặc biệt là nhiễm khuẩn huyết, như vậy, có thể không có những biến đổi huyết học và sinh hóa đáng kể.

KẾT LUẬN

24 chủng *S. aureus* gây bệnh SSSS phân lập tại Bệnh viện Da liễu Trung ương từ tháng 3 năm 2011 đến tháng 3 năm 2012. Kết quả cho thấy, 24 chủng đều mang cả hai gen *eta* và *etb*.

- Trình tự nucleotide của *eta* và *etb* tương đồng 100% với các chủng quốc tế.

- 83% trẻ bị hội chứng bong vảy da và có *S. aureus* mang gen *eta* và *etb* ở độ tuổi nhỏ hơn 3.

- Các trẻ bị hội chứng bong vảy da và có *S. aureus* không có các biến đổi có ý nghĩa thống kê về xét nghiệm huyết học và sinh hóa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Miles, F., et al., *Review of Staphylococcus aureus infections requiring admission to a paediatric intensive care unit*. Arch Dis Child, 2005. 90(12): p. 1274-8.

2. Raulin, O., et al., *Toxin profiling of Staphylococcus aureus strains involved in varicella superinfection*. J Clin Microbiol. 48(5): p. 1696-700.

3. Kato, F., et al., *Regulatory mechanism for exfoliative toxin production in Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 79(4): p. 1660-70.

4. Ladhani, S., et al., *Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome*. Clin Microbiol Rev, 1999. 12(2): p. 224-42.

5. Dinges, M.M., P.M. Orwin, and P.M. Schlievert, *Exotoxins of Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev, 2000. 13(1): p. 16-34, table of contents.

6. De Azavedo, J. and J.P. Arbutnot, *Prevalence of epidermolytic toxin in clinical isolates of Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol, 1981. 14(3): p. 341-4.

7. Lee, C.Y., et al., *Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 1987. 169(9): p. 3904-9.

8. Mehrotra, M., G. Wang, and W.M. Johnson, *Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1*,

9. Yamasaki, O., et al., *Clinical manifestations of staphylococcal scalded-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins*. J Clin Microbiol, 2005. 43(4): p. 1890-3.

10. Ladhani, S., *Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003. 39(2): p. 181-9.

11. Cribier, B., Y. Piemont, and E. Grosshans, *Staphylococcal scalded skin syndrome in adults. A clinical review illustrated with a new case*. J Am Acad Dermatol, 1994. 30(2 Pt 2): p. 319-24.