

Bước đầu ứng dụng PCR trong nghiên cứu mức độ và cơ chế kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn *Haemophilus Influenzae* phân lập từ trẻ em nhiễm khuẩn hô hấp cấp tính

Lương Cao Đồng*; Ishiwada Naruhiko**

TÓM TẮT

Nghiên cứu mức độ kháng thuốc và cơ chế kháng thuốc của 36 chủng vi khuẩn (VK) *H. influenzae* phân lập từ bệnh phẩm đờm của bệnh nhân (BN) nhi bị nhiễm khuẩn hô hấp cấp, điều trị tại Bệnh viện ChiBa, Nhật Bản. Xác định mức độ kháng thuốc bằng ph- ơng pháp đo nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), xác định cơ chế kháng thuốc bằng ph- ơng pháp PCR để đánh giá đột biến gen *fts1* mã hóa PBP-3 của VK. Kết quả cho thấy: tỷ lệ kháng ampicillin chung 52,8%, trong đó kháng ampicillin do sinh β -lactamase 11,1%, không sinh β -lactamase 41,7%. Trong 4 chủng sinh β -lactamase, 1 chủng kháng amoxicillin/axít clavulanic. Trong 15 chủng kháng ampicillin không sinh β -lactamase, 7 chủng đột biến gen ở 1 vị trí, 8 chủng đột biến gen ở 2 vị trí. Các chủng đột biến gen ở 2 vị trí thể hiện MIC cao hơn các chủng đột biến 1 vị trí. Trong 4 chủng sinh β -lactamase, 1 chủng đột biến gen ở 1 vị trí, đồng thời cũng biểu hiện kháng amoxicillin/axít clavulanic. Trong 17 chủng không sinh β -lactamase và không kháng ampicillin có 3 chủng đột biến gen ở 1 vị trí.

* Từ khóa: Nhiễm khuẩn hô hấp cấp; *Haemophilus influenzae*; Kháng kháng sinh.

Applying of PCR in examination of level and antibiotic resistant mechanism of *Haemophilus Influenzae* isolated from pediatric patients with chronic respiratory infections

SUMMARY

Thirty six strains of *H. influenzae* isolated from pediatric patients with respiratory infections were selected for the present study. Antibiotic susceptibilities of those strains were determined by assessing minimum inhibitory concentrations (MIC) to antibiotic agents. Antibiotic resistant mechanism were detected by utilizing PCR assay to find alteration of the *fts1* gene, coding penicillin binding protein-3 (PBP-3). The total resistant rate of *H. influenzae* to ampicillin was 52.8%. Of those strains, β -lactamase producing (BLP) strains were 11.1% and β -lactamase negative ampicillin resistant (BLNAR) strains was 41.7%. Of 4 BLP strains, 1 strain was amoxicillin/clavulanic resistance. Of 15 BLNAR strains, 7 strains had gene alteration in 1 position and 8 strains have gene alteration in 2 positions. Of 4 BLP strains, gene alteration was found in 1 strain, that showed amoxicillin/clavulanic resistance. Especially, of 17 β -lactamase negative strains there were 3 strains revealed the gene alterations in 1 position.

* Key words: Acute respiratory infections; *Haemophilus influenzae*; Antibiotic resistance.

* Bệnh viện 103

** Đại học ChiBa - Nhật Bản

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Thái Sơn

ĐẶT VẤN ĐỀ

Haemophilus influenzae (Hi) là một trong những nguyên nhân VK quan trọng nhất gây

nhiễm khuẩn hô hấp cấp ở trẻ em. Tr- ớc đây, ng- ời ta chỉ biết đến kháng thuốc của Hi là do sinh β -lactamase (TEM-1 hoặc ROB-1). Tuy nhiên, trong những năm gần

đây, nhiều nghiên cứu cho thấy tỷ lệ chủng kháng ampicillin-không sinh β -lactamase (đ- ợc gọi là BLNAR) bắt đầu xuất hiện và có xu h- ớng ngày càng tăng cao [4, 5, 8]. Cơ chế kháng kháng sinh của các chủng BLNAR là biến đổi gen mã hóa penicillin binding proteins (PBPS), đặc biệt là PBP-3A và PBP-3B trên thành tế bào VK làm giảm sức hấp dẫn của kháng sinh đối với VK [3, 7, 8].

Để xác định các chủng BLNAR, ng- ời ta không chỉ sử dụng ph- ơng pháp đo nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của kháng sinh đối với Hi, mà còn có thể xác định bằng đánh giá sự biến đổi gen *fts1* mã hóa PBP của các chủng VK đó.

Việc xác định chính xác các chủng kháng thuốc mới (BLNAR) của VK Hi, đồng thời làm rõ cơ chế và mức độ kháng thuốc của chúng rất cần thiết để các nhà nghiên cứu, đề ra ph- ơng pháp sử dụng kháng sinh hợp lý, nhằm điều trị tốt nhiễm khuẩn hô hấp cấp tính (NKHHCT) do Hi gây ra ở trẻ em.

Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu với mục đích:

- *Đánh giá mức độ kháng kháng sinh của các chủng VK Hi phân lập ở BN nhi bị NKHHCT, điều trị tại Bệnh viện ChiBa, Nhật Bản.*

- *B- ớc đầu làm rõ cơ chế và mô hình kháng thuốc của một số chủng Hi phân lập ở BN nhi bị NKHHCT.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

36 chủng VK Hi phân lập từ bệnh phẩm đờm của trẻ em bị NKHHCT trong năm 2002, điều trị tại Bệnh viện ChiBa, Nhật Bản.

2. Phương pháp nghiên cứu.

- Đo MIC của: ampicillin (ABPC), sulbactam/ ampicillin (SBT/ABPC), cefotaxime, ceftriaxone, cefditoren đối với các chủng trên bằng ph- ơng pháp pha loãng thạch [6, 10].

- Chủng nào có giá trị MIC đối với ABPC $\geq 1,56 \mu\text{g/ml}$ đ- ợc xác định là kháng thuốc [10].

- Xác định các chủng sinh β -lactamase bằng ph- ơng pháp đĩa giấy nitrocefine.

- Đ- a tất cả chủng vào quá trình phân tích gen để xác định sự biến đổi gen mã hóa PBP-3 bằng kỹ thuật PCR theo ph- ơng pháp của Ubukata và CS [6].

- Căn cứ vào kết quả MIC và test β -lactamase, chia các chủng VK thành: β -lactamase (+) (BLP); β -lactamase (+), kháng amoxicillin/axít clavulanic (BLPACR); β -lactamase (-), không kháng ampicillin (BLNAS); β -lactamase (-), kháng ampicillin (BLANR).

- Căn cứ kết quả phân tích gen, chia các chủng thành những nhóm sau: các chủng sinh β -lactamase; các chủng sinh β -lactamase + biến đổi gen 1 vị trí (BLPACR); các chủng không sinh β -lactamase + biến đổi gen 1 vị trí (low BLNAR); các chủng không sinh β -lactamase + biến đổi gen 2 vị trí (BLNAR).

- Mô tả và so sánh mức độ kháng thuốc và mức độ biến đổi gen của mỗi nhóm.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

* Phân bố BN theo tuổi và giới:

- Tuổi: < 1 tuổi: 5 BN (13,9%); 1 - 5 tuổi: 16 BN (44,4%); 6 - 10 tuổi: 9 BN (25%); > 10 tuổi: 6 BN (16,7%).

- Giới: nam: 22 BN (61,1%); nữ: 14 BN (38,9%).

Bảng 1: MIC của ampicillin đối với 36 chủng *H. influenzae*.

NHÓM VK	SỐ CHŨNG	< 0,1	0,1	0,2	0,4	0,8	1,56	3,13	6,25	12,5	> 12,5
Sinh β -lactamase	4	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2
Không sinh β -lactamase	32	0	0	8	6	3	9	2	1	1	2
Tổng	36	0	0	8	6	3	9	3	1	2	4

Bảng 2: MIC của cefotaxime, ceftriaxone và cefditoren đối với 36 chủng *H. influenzae*.

MIC (mcg/ml) KHÁNG SINH	$\leq 0,025$	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,56	> 1,56	TỔNG SỐ CHŨNG
	Cefotaxime	17	8	3	1	3	1	1	2
Ceftriaxone	28	1	1	3	2	0	1	0	36
Cefditoren	24	5	4	2	0	1	0	0	36

Bảng 3: Tỷ lệ các chủng *H. influenzae* theo kết quả β -lactamase test và đo MIC.

NHÓM		SỐ CHŨNG	%
Beta-lactamase (+) (n = 4)	BLPACR	1	2,8
	BLP	3	8,3
Beta-lactamase (-) (n = 32)	BLNAR	15	41,7
	BLNAS	17	47,2
Tổng		36	100,0

* Kết quả phân tích gen nhóm β -lactamase (-):

β -lactamase (-), biến đổi gen 1 vị trí (low BLNAR): 7 chủng (46,7%); β -lactamase (-), biến đổi gen 2 vị trí (BLNAR): 8 chủng (53,3%).

* Kết quả phân tích gen nhóm β -lactamase

(+):

β -lactamase (+), biến đổi gen 1 vị trí (BLPACR-1): 1 chủng (25%); β -lactamase (+), không biến đổi gen (BLP): 3 chủng (75%).

Bảng 4: MIC của ampicillin và cefotaxime đối với các chủng có biến đổi gen ở 1 vị trí (low BLNAR).

CHÚNG	KẾT QUẢ PHÂN TÍCH GEN	MIC CỦA AMPICILLIN (mcg/ml)	MIC CỦA CEFOTAXIME (mcg/ml)
1	Low BLNAR	1,56	0,1
2	Low BLNAR	1,56	0,1
3	Low BLNAR	3,13	0,05
4	Low BLNAR	3,13	0,05
5	Low BLNAR	1,56	0,05
6	Low BLNAR	1,56	0,05
7	Low BLNAR	1,56	0,05

Bảng 5: MIC của ampicillin và cefotaxime đối với các chủng biến đổi gen 2 vị trí (BLNAR).

CHÚNG	KẾT QUẢ PHÂN TÍCH GEN	MIC CỦA AMPICILLIN (mcg/ml)	MIC CỦA CEFOTAXIME (mcg/ml)
1	BLNAR	> 12,5	> 1,56
2	BLNAR	12,5	> 1,56
3	BLNAR	> 12,5	1,56
4	BLNAR	1,56	0,8
5	BLNAR	6,25	0,4
6	BLNAR	1,56	0,4
7	BLNAR	1,56	0,4
8	BLNAR	1,56	0,2

Bảng 6: MIC của một số kháng sinh và kết quả phân tích gen đối với các chủng H. influenzae sinh β -lactamase.

CHÚNG	KẾT QUẢ PHÂN TÍCH GEN	MIC CỦA AMPICILLIN (MCG/ML)	MIC CỦA AMOXICILLIN/C LAVULANIC AXIT (mcg/ml)	MIC CỦA CEFOTAXIME (mcg/ml)
1	BLP	3,13	0,4	$\leq 0,025$

2	BLP	12,5	0,8	$\leq 0,025$
3	BLP + đột biến 1 vị trí	> 12,5	1,56	0,05
4	BLP	> 12,5	6,25	0,1

Bảng 7: Kết quả phân tích gen của các chủng không sinh β -lactamase và nhạy cảm với ampicillin.

MIC CỦA AMPICILLIN (mcg/ml)	KẾT QUẢ PHÂN TÍCH GEN		SỐ CHÚNG (n = 17)
	Đột biến 1 vị trí (n = 3)	Không đột biến (n = 14)	
0,8	3	0	3
0,4	0	6	6
0,2	0	8	8

BÀN LUẬN

Lần đầu tiên chủng H. influenzae kháng ampicillin đ-ợc phát hiện ở Mỹ vào năm 1974, với khả năng sản xuất ra β -lactamase TEM-1 hay ROB-1 [8]. Tại Việt Nam, một số nghiên cứu cũng công bố, nh- ng tỷ lệ kháng kháng sinh của Hi đang gia tăng rất cao [1]. Tỷ lệ phân lập của chủng BLP trong nghiên cứu của chúng tôi là 11,1%, thấp hơn trong một số nghiên cứu tr-ớc đây, trong khi đó, tỷ lệ kháng kháng sinh chung vẫn ở mức cao (52,8%).

Nghiên cứu này phát hiện đ-ợc 41,7% số chủng kháng lại ampicillin nh- ng không sinh β -lactamase (BLNAR). Theo các số liệu nghiên cứu tr-ớc, chủng BLNAR đầu tiên đ-ợc phát hiện vào năm 1980 ở Mỹ [8]. Trong những năm gần đây, một số nghiên cứu ở Canada và Nhật Bản cho thấy: tần suất các chủng này đang tăng rất nhanh [2, 5]. Kết quả của chúng tôi phù hợp với

những nghiên cứu gần đây về sự gia tăng của các chủng BLNAR.

Theo một số tác giả, các chủng BLNAR có khả năng kháng kháng sinh là do chúng có biến đổi gen mã hóa một protein gọi là BPB-3 ở thành tế bào của VK, làm thay đổi cấu trúc của phân tử PBP-3, do đó làm giảm lực hấp dẫn của kháng sinh với VK. Vì vậy, kháng sinh không có tác dụng diệt khuẩn [3]. Trong những nghiên cứu đó, đã xác định đ- ợc vị trí đột biến của gen, đồng thời cũng thấy mức độ biến đổi gen sẽ ảnh hưởng tới mức độ kháng thuốc của VK đó. Những chủng có đột biến gen ở 2 vị trí, khả năng kháng ampicillin cao hơn và còn có khả năng kháng nhiều loại kháng sinh khác, thậm chí cả những kháng sinh thuộc thế hệ mới nh- cephalosporin thế hệ thứ III. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát hiện đ- ợc cơ chế kháng thuốc mới của 15 chủng BLNAR đều có biến đổi gen, trong đó, 7 chủng biến đổi gen ở 1 vị trí và 8 chủng biến đổi gen ở 2 vị trí. So sánh mức độ kháng ampicillin của các chủng đột biến gen ở 1 vị trí và ở 2 vị trí, chúng tôi thấy: các chủng đột biến ở 2 vị trí có độ kháng ampicillin cao hơn. Không những thế, MIC của kháng sinh thế hệ mới hơn nh- : cefotaxime và ceftriaxone đều cao hơn nhóm chỉ đột biến gen ở 1 vị trí.

Ngoài các chủng kháng ampicillin do sinh β -lactamase và kháng ampicillin do biến đổi gen mã hóa PBP-3, nhiều nghiên cứu tr- ớc đây còn chỉ ra rằng có một tỷ lệ nhỏ chủng sinh β -lactamase, nh- ng lại kháng với amoxicillin/axít clavulanic. Những

chủng này cùng lúc sở hữu 2 cơ chế kháng thuốc là sinh β -lactamase và đồng thời biến đổi gen mã hóa PBP-3. Nghiên cứu này phần nào minh chứng đ- ợc điều này khi phát hiện 1 trong 4 chủng sinh β -lactamase kết hợp có biến đổi gen ở 1 vị trí. Đồng thời, ph- ơng pháp đo MIC cũng cho kết quả phù hợp khi chủng này kháng cả ampicillin và amoxicillin/axít clavulanic.

Ngoài ra, chúng tôi còn thấy trong số 17 chủng không sinh β -lactamase và MIC của ampicillin đối với chúng đều $< 1,56$ mcg/ml, 3 chủng có biến đổi gen ở 1 vị trí. Điều này có thể lý giải: những chủng này đã kháng ampicillin, nh- ng do hạn chế trong ph- ơng pháp đo MIC nên kết quả ch- a đúng và bỏ sót khi đánh giá mức độ kháng kháng sinh của chúng. Vì vậy, có thể hiểu kỹ thuật PCR phát hiện biến đổi gen mã hóa PBP-3 rất có ý nghĩa trong chẩn đoán kháng thuốc của VK Hi, do độ tin cậy và độ chính xác cao.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này cho thấy: tỷ lệ chủng Hi kháng thuốc rất cao, trong đó, đa số có cơ chế kháng thuốc mới mà không sinh β -lactamase.

Kỹ thuật PCR phát hiện các chủng kháng kháng sinh mà không sinh β -lactamase đều có biến đổi gen mã hóa PBP-3 ở 1 hoặc 2 vị trí. Mức độ biến đổi gen mã hóa PBP-3 có liên quan tới mức độ kháng kháng sinh của VK.

Các chủng kháng thuốc theo cơ chế mới, không chỉ kháng đơn kháng sinh, mà còn kháng nhiều kháng sinh, bao gồm cả kháng sinh thế hệ mới nh- kháng sinh thuộc nhóm cephalosporin thế hệ thứ III.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1.. Hoàng Ngọc Hiến, Trần Viết Thắng. Độ nhạy cảm kháng sinh của VK gây NKHHCT ở trẻ em gặp tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Yên Bái. Một số công trình nghiên cứu về độ nhạy cảm của VK với thuốc kháng sinh (1994 - 1995). Viện Thông tin Y học TW. Hà Nội.
2. Lê Huy Chính, Phạm Lê Hùng. Sự nhạy cảm kháng sinh của *S. pneumoniae* và *H. influenzae* ở Thái Nguyên từ tháng 9 - 1992 đến 12 - 1994. Tạp chí Thông tin Y d- ợc, Viện Thông tin Y học TW. Hà Nội. 1995, pp.124-127.
3. Trần Đỗ Hùng. Nghiên cứu tỷ lệ, mức độ kháng kháng sinh của *H. influenzae* và *S. pneumoniae* ở trẻ em < 60 tháng tuổi lành và bị viêm phổi tại Cần Thơ. Luận án Tiến sỹ Y học. Học viện Quân y. Hà Nội. 2007.
4. Bisgard K.M., Kao A., Leake J., Strebel P.M., Perkins B.A., Wharton M. *Haemophilus influenzae* invasive disease in the United States, 1994-1995: Near disappearance of a vaccine-preventable childhood disease. Emerg Infect Dis. 1998, 4, pp.229-237.
5. Blondeau J.M., Vaughan D., Laskowski R., Borsos S. The Canadian Antimicrobial Group. Susceptibility of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pneumoniae* to oral antimicrobial agents. Int J Antimicrob Agents. 2001, 17, pp.457-464.
6. Campos J.M. *Haemophilus*. In: Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover R.H. (Eds.) Manual of Clinical Microbiology, 7th edition. Washington DC. ASM Press. 1999, pp.604-613.
7. Critchley I.A., Blossor R.S., Karlowsky J.A., Yamakita J., Barth A., Sader H.S., Mendes C., Teixeira L., Rossi F., Dias C.A.C., Jones M.E., Thornsberry C., Sahm D.F. Antimicrobial resistance in respiratory pathogens isolated in Brazil during 1999 - 2000. Bra J Infect Dis. 2001, 5, pp.294-304.
8. Doern G.V., Brueggemann A.B., Pierce G., Holley H.P., J.R., Rauch A. Antibiotic resistant among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of β -lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: Results of a national multicenter surveillance study. Antimicrob agents chemother. 1997, 41, pp.292-297.
9. Falla T.J., Crook D.W.M., Brophy L.N., Maskell D., Kroll J.S., Moxon E.R. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 1994, 32, pp.2382-2386.
10. Goto S., Jyo K., Kawakita R., Kosakai N., Mitsuhashi S., Nishino T., Ohsawa N., Tanami H. Revision of laboratory standard method for measuring minimum inhibitory concentration (MIC). Chemother. 1981, 29, pp.76-79. (In Japanese).

