

Định danh phân tử và khảo sát đặc tính kháng kháng sinh của *Streptococcus* gây viêm họng cấp ở người

Giang Cẩm Tú*, Lê Nhật Vinh, Nguyễn Thị Kim Thuy, Thân Văn Thái

Khoa Công nghệ Sinh Học, Đại học Nguyễn Tất Thành

*gctu@ntt.edu.vn, gcamtu@gmail.com

Tóm tắt

Viêm họng cấp là bệnh nhiễm trùng hô hấp phổ biến, tùy thuộc tác nhân gây bệnh và sức đề kháng của cơ thể bệnh có thể chuyển biến nặng hơn. Nghiên cứu nhằm phân lập, định danh phân tử, khảo sát đặc tính kháng kháng sinh của một số chủng vi khuẩn *Streptococcus* gây viêm họng cấp ở người. Từ 50 mẫu bệnh phẩm sau khi nuôi cấy phân lập được 125 chủng vi khuẩn; tiến hành nhuộm Gram thu được 44/125 chủng có dạng liên cầu. Trong đó, 38/44 chủng là vi khuẩn Gram dương (+), 6/44 chủng là vi khuẩn Gram âm (-), chúng tỏ 38/44 chủng này có khả năng là các chủng *Streptococcus*. Từ 38 chủng liên cầu Gram dương, chọn ngẫu nhiên 4 chủng tiến hành tách chiết DNA, chạy PCR và giải trình tự gen 16S rRNA. Kết quả cho thấy các chủng vi khuẩn nghiên cứu thuộc nhóm vi khuẩn *Streptococcus* và chia sẻ mức độ tương đồng gần nhất với các chủng *S. mitis*, *S. oralis*, *S. pseudopneumoniae*. Khảo sát đặc tính kháng kháng sinh của 4 chủng 155, 157, 158, 159 với 4 loại kháng sinh: Amoxicillin, Azithromycin, Cephalexin, Clindamycin cho thấy cả bốn chủng đều kháng với Amoxicillin, Azithromycin, Cephalexin và mức độ nhạy cảm yếu với Clindamycin.

Nhận 05.12.2019

Được duyệt 27.05.2020

Công bố 29.06.2020

Từ khóa

Streptococcus,
viêm họng cấp,
kháng sinh đồ

© 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Viêm họng cấp là bệnh nhiễm trùng hô hấp phổ biến, tùy thuộc tác nhân gây bệnh và sức đề kháng của cơ thể bệnh có thể chuyển biến nặng hơn. *Streptococcus* là nguyên nhân gây ra hàng loạt các nhiễm trùng đường hô hấp cấp và có nguy cơ trở thành bệnh xâm lấn nghiêm trọng: viêm họng, viêm da mũ,... để lại các di chứng tự miễn như sốt thấp khớp và viêm cầu thận.

Nhiều nghiên cứu về chủng vi khuẩn này và khả năng kháng thuốc của chúng diễn hình như nghiên cứu “Ưu thế của *emm* 4 và kháng kháng sinh của *S. pyogenes* trong viêm họng cấp tính ở một khu vực phía Nam của Hàn Quốc” của Seungwook Kim et al. năm 2019. Kết quả cho thấy tổng cộng có 190 chủng (53,1%) *S. pyogenes* được phân lập từ 358 trẻ, tỉ lệ kháng kháng sinh đối với Erythromycin, Clindamycin, Tetracycline và Ofloxacin lần lượt là 3,2%, 2,6%, 1,1% và 2,6% [1]. Baidaa Rasoul Dakhil và cộng sự năm 2019 đã nghiên cứu “Nhạy cảm với kháng sinh của *S. pyogenes* và *Staphylococcus aureus* phân lập từ bệnh nhân viêm họng và viêm amidan ở thành phố Nasiriyah, Iraq” Kết quả cho thấy trong 276 mẫu bệnh phẩm thu được từ bệnh nhân có độ tuổi từ 10 đến 70 tuổi ở thành phố

Nasiriyah trong khoảng thời gian từ tháng 11 năm 2014 đến tháng 5 năm 2015 có 34 mẫu *S. pyogenes* và 62 *Staphylococcus aureus*. Tất cả *S. pyogenes* nhạy cảm với Vancomycin và Ceftriaxon; kháng hoàn toàn với Ampicillin và Amikacin. *Staphylococcus aureus* phân lập được nhạy cảm với Clindamycin và Amikacin; kháng với Ampicillin và Augmentin (Amoxicillin / Clavulanic acid) [2].

Trong nước cũng có một vài nghiên cứu về các chủng *Streptococcus* và mức độ kháng kháng sinh của chúng trên các loại kháng sinh khác nhau, như năm 2017, Phạm Khắc Linh và cộng sự “Nghiên cứu độ nhạy cảm kháng sinh của các chủng *Streptococcus* nhóm A, C, G phân lập từ nhầy họng học sinh tiểu học giai đoạn 2012 – 2015”. Kết quả nghiên cứu từ 67 chủng liên cầu khuẩn trong đó có 40 chủng thuộc nhóm A; 7 chủng thuộc nhóm C và 20 chủng thuộc nhóm G. Tất cả các chủng liên cầu khuẩn nhóm A, C, G phân lập trong giai đoạn 2012 - 2015 đều nhạy cảm với nhóm Cephalosporin và Vancomycin, đồng thời kháng Amikacin. Tỉ lệ kháng của liên cầu khuẩn nhóm A đối với Tetracyclin là 70% và Doxycilin là 75%. Mức độ kháng đối với Erythromycin của liên cầu nhóm A là 52,5%, liên cầu khuẩn nhóm C và G là 40,74%. Các kháng sinh nhóm Cephalosporin thế hệ thứ 3,4 và Vancomycin được coi là



những thuốc thiết yếu có thể sử dụng để điều trị các bệnh do liên cầu khuẩn nhóm A, C và G gây ra. Không phát hiện thấy mối liên quan giữa sự có mặt của các gen *mefA* và *ermTR* trong cơ chế kháng Erythromycin của các chủng liên cầu khuẩn. Trong hệ gen của các chủng liên cầu khuẩn nhóm A có đoạn gen nhảy chứa gen kháng Tetracyclin[3].

Việt Nam là quốc gia có tỉ lệ kháng kháng sinh cao do sử dụng khá nhiều loại kháng sinh và hầu hết là không theo đơn, do vậy, việc nghiên cứu nhận diện và cập nhật thông tin về các chủng vi khuẩn gây bệnh và mức độ kháng với một số loại kháng sinh thông dụng trên thị trường để điều trị hiệu quả, giảm thiểu biến chứng là cấp thiết.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

Các mẫu bệnh phẩm được thu tại Bệnh viện Thống Nhất, sau đó sẽ được bảo quản lạnh, vận chuyển về phòng thí nghiệm, nuôi cấy ngay trong vòng 4 giờ kể từ lúc lấy mẫu. Tất cả các bệnh nhân đều được đánh giá sơ bộ bằng thang điểm MacIssax - Centor Strep và sau đó mẫu được thu bằng cách dùng tăm bông lấy dịch tiết ra từ cổ họng của bệnh nhân nghi ngờ mắc bệnh viêm họng cấp.

2.2 Hóa chất:

Bộ nhuộm Gram

Môi trường NA

Môi trường BHI

Khoanh giấy kháng sinh Amoxicillin 10µg, Azithromycin 15µg, Cephalexin 30µg, Clindamycin 2µg

2.3 Phương pháp thí nghiệm

2.3.1 Phương pháp nuôi cấy chủng *Streptococcus*

Các mẫu bệnh phẩm được thu tại Bệnh viện Thống Nhất sau khi đem về sẽ được nuôi cấy trên môi trường thạch NA và tăng sinh trong môi trường BHI

2.3.2 Nhuộm Gram và quan sát hình thái

Sau khi nuôi cấy các khuẩn lạc có hình dạng tương tự hình dạng của *Streptococcus* trong các nghiên cứu trước đây như dạng hình tròn, mô, bề mặt nhẵn, có viền rõ ràng, màu trắng xám[4] sẽ được chọn ra để tiến hành làm thuần, tăng sinh, nhuộm Gram quan sát hình xem có đúng là liên cầu Gram dương +.

2.3.3 Giải trình tự vùng gen 16S rRNA.

Kết quả nhuộm Gram cho thấy các chủng liên cầu Gram dương + ở các mẫu, bước đầu nhận định các chủng này có khả năng cao chính là *Streptococcus*. Sau đó tiến hành tách chiết DNA và chạy PCR với cặp mồi 27F và 1492R[5] của gen 16S rRNA để đưa đi giải trình tự ở Công ty 1st Base, Malaysia.

2.3.4 Lập cây phát sinh loài

Sau khi có được kết quả giải trình tự, dựa trên các trình tự thu được, tìm kiếm cơ sở dữ liệu trên ngân hàng gen (Genbank) bằng phần mềm trực tuyến BLAST tại NCBI. Trình tự gen được sắp xếp sử dụng chương trình CLUSTAL 2X alignment. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa vào phần mềm MEGA 6.06 sử dụng công cụ vẽ cây Neighbor joining tree với Bootstrap re-sampling 1.000 lần.

2.3.5 Kháng sinh đồ bằng khoanh giấy khếch tán

Các chủng *Streptococcus* xác định được sẽ tiến hành thử nghiệm kháng sinh đồ với một số loại kháng sinh thông dụng như Amoxicillin, Azithromycin, Cephalexin, Clindamycin

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả nuôi cấy *Streptococcus*

Từ 50 mẫu bệnh phẩm, sau khi tiến hành trải mẫu, quan sát hình thái khuẩn lạc thu được 125 chủng vi khuẩn với các đặc điểm: màu vàng, trắng trong hoặc trắng đục, hình dạng khuẩn lạc đa số là dạng tròn đều, còn lại là dạng không đều; về dạng bìa và độ nổi thì 100% khuẩn lạc thu được có bìa nguyên, đa số bề mặt khuẩn lạc trơn và có độ nổi, chỉ một số ít dạng lồi.

Bảng 1 Hình thái và số lượng khuẩn lạc

Đặc điểm hình thái				Số lượng
Màu sắc	Hình dạng	Dạng bìa	Độ nổi	
Trắng đục	Tròn	Nguyên	Mô	28
Trắng trong	Tròn	Nguyên	Lồi	30
Trắng trong	Tròn	Nguyên	Mô	16
Trắng trong	Không đều	Nguyên	Mô	2
Dạng khác				49

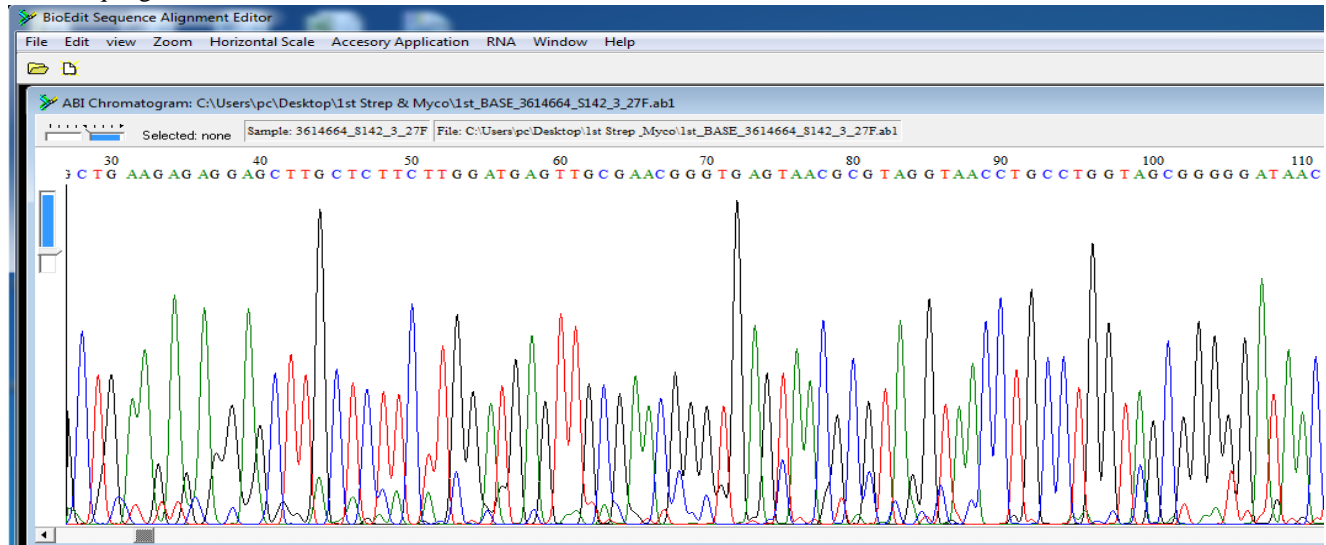
3.2 Kết quả nhuộm Gram quan sát hình thái



Hình 1 Hình nhuộm Gram vi khuẩn (quan sát ở vật kính 40)

Các khuẩn lạc có dạng tương tự như của *Streptococcus* được tiến hành nhuộm Gram. Từ 125 chủng vi khuẩn phân lập được có 44/125 chủng có tế bào dạng liên cầu ngắn hoặc dài, 81 chủng còn lại có hình dạng tế bào khác. Trong tổng số 44 chủng liên cầu có 38/44 chủng bắt màu tím của thuốc nhuộm chứng tỏ là vi khuẩn Gram dương, còn lại 6/44 chủng là vi khuẩn Gram âm.

3.3 Kết quả giải trình tự



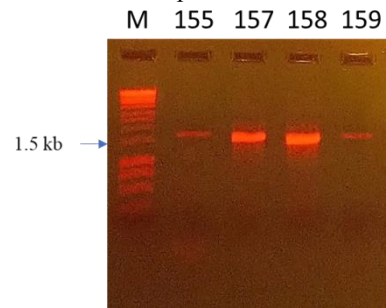
A = Ademine, T = Thyamine, C = Cystein, G = Guanine

Hình 3 Kết quả đọc trình tự gen bằng phần mềm BioEdit

3.4 Kết quả xây dựng cây phát sinh loài

Dựa vào kết quả giải trình tự và BLAST trên cơ sở dữ liệu NCBI, đã xây dựng được cây phát sinh loài cho gen 16S rRNA của 04 chủng *Streptococcus* trong nghiên cứu này. Cây phát sinh loài được vẽ bằng phần mềm Mega 6.06 theo phương pháp Neighbor - joining tree với model Maximum composite likelihood và bootstrap 1.000 lần. Các chủng

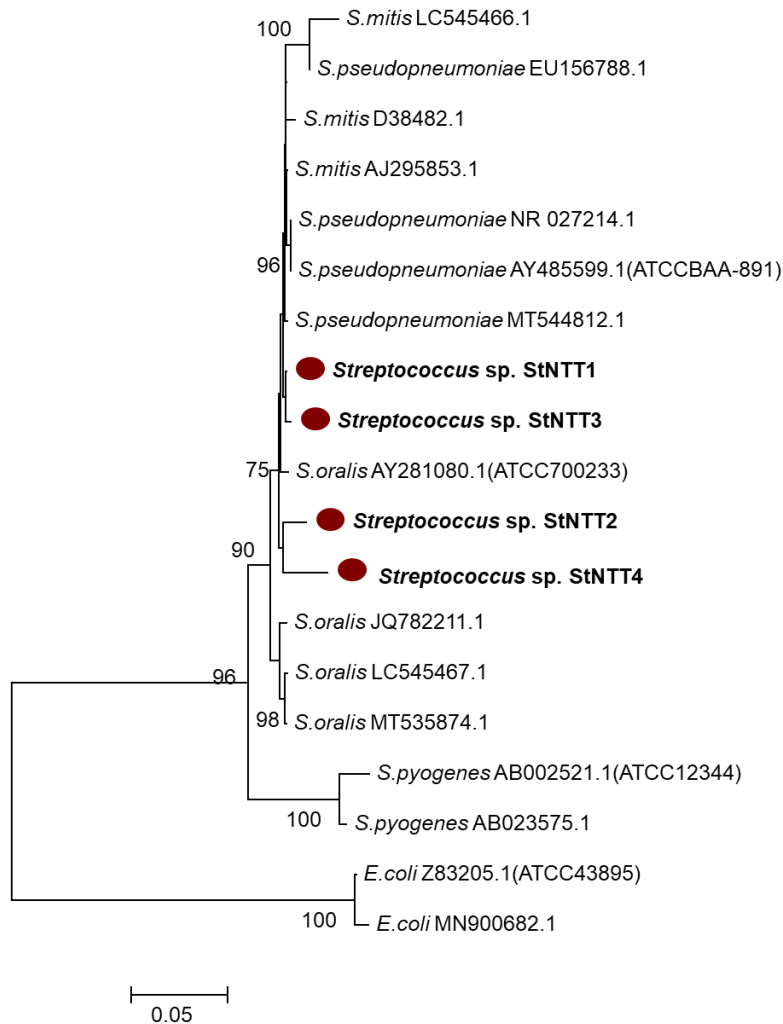
Chọn ngẫu nhiên 4 chủng liên cầu Gram dương + tiến hành PCR với cặp mồi 27F và 1492R để khuếch đại gen 16S rRNA và đưa đi giải trình tự sản phẩm của quá trình PCR này có kích thước là 1500 bp.



Hình 2 Kết quả điện di sản phẩm PCR với mồi 27 F và 1492 R

Sản phẩm khuếch đại DNA được giải trình tự tự động tại Công ty 1st Base, Malaysia theo phương pháp giải trình tự Sanger. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm BioEdit

Streptococcus chia sẻ mức độ tương đồng cao được sử dụng làm các chủng vi khuẩn tham chiếu và chủng vi khuẩn *E. coli* được sử dụng làm outgroup. Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này thuộc nhóm *Streptococcus* và gần gũi với các chủng vi khuẩn *S. mitis*, *S. oralis*, và *S. pseudopneumoniae* (cả ba đều thuộc nhóm *Streptococcus viridans*) (Hình 4).

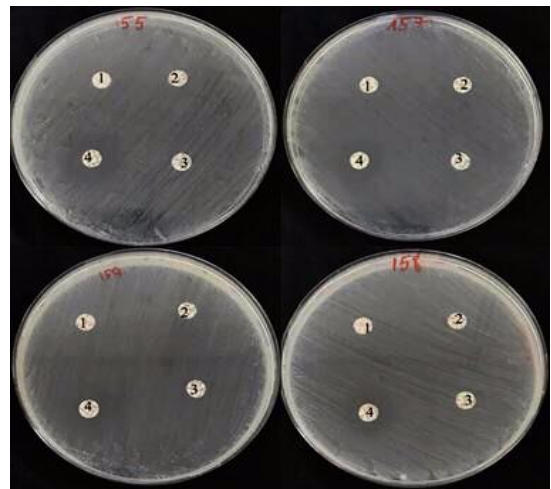


Hình 4 Cây phát sinh loài gen 16S rRNA của các chủng *Streptococcus* nghiên cứu với các chủng tham chiếu

3.5 Kết quả thử nghiệm kháng sinh đồ bằng phương pháp khoan giấy khuếch tán

Mẫu đối chứng sử dụng trong thử nghiệm kháng sinh đồ bằng phương pháp khoan giấy khuếch tán là *Staphylococcus aureus* NRRL B 313 với 4 loại kháng sinh Amoxicillin 10µg, Azithromycin 15µg, Cephalexin 30µg, Clindamycin 2µg.

Kết quả kháng sinh đồ của bốn mẫu giải trình tự không có sự hiện diện của vòng kháng khuẩn xung quanh khoan giấy kháng sinh Amoxicillin, Azithromycin, Cephalexin. Từ đó cho thấy khả năng kháng kháng sinh cao của 4 loại vi khuẩn phân lập đối với 3 loại kháng sinh nêu trên. Nhưng trong đó cả 4 chủng đều xuất hiện vòng kháng khuẩn mờ xung quanh khoan giấy test kháng sinh Clindamycin cho thấy sự nhạy cảm yếu đối với Clindamycin



1: Azithromycin ,2: Amoxicillin, 3: Cephalexin, 4: Clindamycin

Hình 5 Kháng sinh đồ của các chủng đã được giải trình tự

4 Kết luận và kiến nghị

4.1 Kết luận

Với mục tiêu phân lập được các dòng vi khuẩn gây viêm họng cấp và khảo sát mức độ kháng sinh của chúng, kết quả bước đầu đã đáp ứng với mục tiêu đề ra. Từ 50 mẫu bệnh phẩm sau khi nuôi cấy phân lập được 125 dòng vi khuẩn thuần. Trong số 125 chủng này tiến hành nhuộm Gram và quan sát hình thái thu được 44/125 chủng có dạng liên cầu. Trong đó 38/44 chủng là vi khuẩn Gram dương (+), 6/44 chủng là vi khuẩn Gram âm (-) chứng tỏ 38/44 chủng này có khả năng chính là các chủng *Streptococcus*. Từ 38 chủng liên cầu Gram dương, chọn ngẫu nhiên 4 chủng tiến hành tách chiết DNA, chạy PCR và giải trình tự gen 16S rRNA. Kết quả nhận được tiến hành xây dựng và phân tích cây phát sinh loài gen 16S rRNA cho thấy các chủng vi khuẩn nghiên cứu thuộc nhóm vi khuẩn *Streptococcus* và chia sẻ mức độ tương đồng gần nhất với các chủng *S. mitis*, *S. oralis*, *S. pseudopneumoniae*. Kết quả

khảo sát đặc tính kháng kháng sinh của 4 chủng 155, 157, 158, 159 với 4 loại kháng sinh: Amoxicillin, Azithromycin, Cephalexin, Clindamycin cho thấy cả bốn chủng đều kháng với Amoxicillin, Azithromycin, Cephalexin và mức độ nhạy cảm yếu với Clindamycin

4.2 Kiến nghị

Tiếp tục giải trình tự các chủng liên cầu khuẩn còn lại để xác định chính xác các chủng *Streptococcus*.

Tiến hành khảo sát đặc tính kháng kháng sinh của tất cả các chủng *Streptococcus* phân lập được với các loại kháng sinh thông dụng và ở các mức nồng độ kháng sinh khác nhau để có thể có cảnh báo chính xác tình trạng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn *Streptococcus* gây viêm họng cấp.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ NTTU, đề tài mã số 2019.01.42

Tài liệu tham khảo

1. Seungwook Kim, Seungjun Lee, Hyunwoong Park và Sunjoo Kim (2019). Predominance of emm 4 and antibiotic resistance of *Streptococcus pyogenes* in acute pharyngitis in a southern region of Korea. *Journal of medical microbiology*, 68.
2. Baidaa Rasoul Dakhil, Salman Saad và Saad Hamim (2019). World Journal of Pharmaceutical Sciences Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* isolated from Pharyngitis and Tonsillitis patients in Nasiriyah City, Iraq. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4: 14-19.
3. Phạm Khắc Linh, V. Dmitriev A., Vũ Hoàng Giang, Vũ Thị Loan, Võ Việt Cường, G. Nosik A. và IU Ilyasov IU. (2017). Nghiên cứu độ nhạy cảm kháng sinh của các chủng streptococcus nhóm A, C, G phân lập từ nhầy họng học sinh tiểu học giai đoạn 2012 - 2015 *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nhiệt đới*, (13): 50 -58.
4. Lê Huy Chính (2007). Vi sinh vật Y học. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
5. (2018). Design of Primers for Evaluation of Lactic Acid Bacteria Populations in Complex Biological Samples. *Microbiol* 9:2045
6. Rasoul Dakhil B, Saad S, Hamim S. (2019).World Journal of Pharmaceutical Sciences Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* isolated from Pharyngitis and Tonsillitis patients in Nasiriyah City, Iraq. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 06/15 2019;4:14-19.
7. Khosravi AD, Ebrahimifard N, Shamsizadeh A, Shoja S. (2016). Isolation of *Streptococcus pyogenes* from children with pharyngitis and emm type analysis. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2016/05/01/ 2016;79(5):276-280.
8. Fine AM, Nizet V, Mandl KD. (2012). Large-scale validation of the Centor and McIsaac scores to predict group A streptococcal pharyngitis. *Arch Intern Med*. 2012;172(11):847-852.
9. Rathod S, Muzaheed, Pillai H P J. (2016). Epidemiology of *Streptococcus pyogenes* in Pyogenic Infections in Gulbarga, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 10/15 2016;5:1030-1038.

Molecular identification and survey of antibiotic resistance properties of streptococcus bacteria causing acute pharyngitis in humans

Giang Cam Tu*, Le Nhat Vinh, Nguyen Thi Kim Thuy, Than Van Thai

Biotechnology, Nguyen Tat Thanh University

*gctu@ntt.edu.vn, gcamtu@gmail.com

Abstract Topics: "Molecular identification and survey of antibiotic resistance properties of *Streptococcus* bacteria causing acute pharyngitis in humans" with the objective of isolating, identifying molecular and investigating antibiotic resistance of some strains of *Streptococcus* bacteria causing acute pharyngitis in humans. From 50 samples after culture, 125 bacterial strains were isolated. Out of 125 strains, Gram stained and observed morphology 44/125 strains of streptococci of which 38/44 strains were Gram (+), 6/44 were Gram (-) proving that 38/44 strains are likely to be *Streptococcus* strains. From 38 Gram - positive streptococcal strains, randomly selected 4 strains were conducted for DNA extraction, PCR run and gen 16S rRNA sequencing (04 samples) see the bacterial strains studied in the group *Streptococcus* and share the closest similarity with strains of *S. mitis*, *S. oralis*, *S. pseudopneumoniae*. Survey results of antibiotic resistance showed that all 4 strains 155, 157, 158, 159 are resistant to 3 types of antibiotics: Amoxicillin, Azithromycin, Cephalexin and sensitive to Clindamycin.

Keywords *Streptococcus*, acute pharyngitis, antibiotics