

ĐẶC ĐIỂM KIỂU GEN CỦA HAI CHỦNG *S. AUREUS* VÀ *S. HAEMOLYTICUS* KHÁNG TRUNG GIAN VỚI VANCOMYCIN PHÂN LẬP TẠI BỆNH VIỆN QUÂN Y 7A

Nguyễn Thị Lệ Thủy^{1*}, Nguyễn Thị Khánh Ngâu^{1,2}, Thượng Thị Thu Thủy¹, Nguyễn Ngọc Lệ³, Nguyễn Mạnh Kiên³, Nguyễn Hoàng Thiên Phúc⁴, Nguyễn Thụy Vy⁴, Phạm Thị Kim Trâm¹, Lê Quang Trí³, Morikawa Kazuya⁵, Nguyễn Đăng Quân¹

¹ Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

² Trường Đại học Khoa học tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

³ Bệnh viện Quân y 7A

⁴ Bộ môn Di truyền, Khoa Sinh học và Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

⁵ Đại học Tsukuba, Nhật Bản

TÓM TẮT

Tụ cầu khuẩn kháng methicillin (bao gồm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA và các tụ cầu không có enzyme coagulase - methicillin-resistant coagulase negative staphylococci - MRCNS) được ghi nhận là một trong những tác nhân chính trong nhiễm khuẩn bệnh viện cũng như nhiễm khuẩn trong cộng đồng, gây ra ảnh hưởng lớn tới việc điều trị. Vancomycin là thuốc sử dụng hiệu quả và được xem là “lựa chọn cuối cùng” trong điều trị MRSA và MRCNS. Tuy nhiên, tỷ lệ thất bại trong điều trị nhóm vi khuẩn này bằng vancomycin có xu hướng gia tăng do xuất hiện các vi khuẩn kháng trung gian và đề kháng với kháng sinh này. Trong nghiên cứu này, chúng tôi mô tả đặc điểm kiểu gen kháng thuốc của hai chủng *S. aureus* và *S. haemolyticus* kháng trung gian với vancomycin được phân lập từ bệnh nhân tại Bệnh viện Quân y 7A. Nồng độ thuốc ức chế tối thiểu của vancomycin (MIC) ghi nhận trên hai vi khuẩn lần lượt là 12 mg/L và 6 mg/L. Bằng phương pháp giải trình tự toàn bộ gen, chúng tôi xác định sự hiện diện của các biến thể với sự thay đổi trình tự amino acid ở các gen điều hòa *vraSR*, *graSR*, *lytSR*, *walKR* liên quan đến tính kháng vancomycin, tính kháng với các peptide kháng khuẩn và chuyển hóa thành tế bào trên 2 chủng vi khuẩn này. Bên cạnh các đột biến gây ra tính kháng trung gian với vancomycin, sự hiện diện của nhiều gen kháng với các nhóm thuốc kháng sinh phổ biến khác cũng được ghi nhận. Việc sử dụng kháng sinh đại trà và thiếu kiểm soát góp phần làm gia tăng xuất hiện các đột biến gây ra tính kháng thuốc.

Từ khóa: Tụ cầu khuẩn, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, kháng trung gian với vancomycin.

MỞ ĐẦU

Trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng, hầu hết các bệnh viện và các cơ sở khám chữa bệnh đang phải đối mặt với tốc độ lan rộng của các vi khuẩn có khả năng kháng với nhiều loại kháng sinh. Bệnh nhân mắc nhiễm khuẩn bệnh viện (NKBV) thường được điều trị với nhiều loại thuốc kháng sinh. Điều này dẫn tới sự xuất hiện các chủng vi khuẩn kháng và đa kháng thuốc. Hậu quả càng nghiêm trọng hơn khi sự kháng thuốc có xu hướng lan truyền nhanh chóng trong môi trường bệnh viện cũng như trong cộng đồng.

Tụ cầu khuẩn kháng methicillin (bao gồm Methicillin-resistant *staphylococcus aureus* - MRSA và các tụ cầu không có enzyme coagulase - Methicillin-resistant coagulase negative staphylococci - MRCNS) là một trong những tác nhân chính trong NKBV có ảnh hưởng lớn tới việc điều trị. Vancomycin là kháng sinh thuộc nhóm glycopeptide được xem là thuốc sử dụng hiệu quả trong điều trị MRSA và MRCNS. Tuy nhiên, đã phát hiện chủng MRSA kháng trung gian với vancomycin (Vancomycin intermediate-resistant *S. aureus* - VISA) đầu tiên tại Nhật Bản vào năm 1997 và sau đó là ở các nước khác. Năm 2002, tại Mỹ đã phát hiện chủng *S. aureus* kháng hoàn toàn với vancomycin (Vancomycin resistant *S. aureus* - VRSA) (Sievert et al., 2008). Các chủng kháng vancomycin được xác định có sự hiện diện của gen *vanA* mã hóa cho enzyme ligase tham gia vào sự hình thành liên kết D-Ala-D-Lac thay cho liên kết D-Ala-D-Ala trong quá trình tổng hợp lớp peptidoglycan của vách tế bào. Sự thay thế này làm giảm ái lực gắn với vancomycin, gây ra tính kháng thuốc (Perichon et al., 2009). May mắn là tỷ lệ VRSA phát hiện còn khá ít. Tại Việt Nam, chưa có báo cáo về trường hợp *S. aureus* hay CNS đề kháng với vancomycin. Tuy nhiên, đã ghi nhận thấy sự gia tăng tỷ lệ thất bại trong điều trị bằng vancomycin ở nhóm vi khuẩn này. Theo hướng dẫn của Viện Các qui chuẩn lâm sàng và xét nghiệm (CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute), vi khuẩn được xem là nhạy cảm với vancomycin khi có nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum inhibitory concentration - MIC) ≤ 2 mg/L đối với *S. aureus* và ≤ 4 mg/L đối với các tụ cầu không có enzyme coagulase (coagulase-negative staphylococci - CNS). Kháng trung gian (vancomycin-intermediate resistance)

được xác định khi giá trị MIC là 4 - 8 mg/L với *S. aureus* hay 4 - 16 mg/L với CNS. Vi khuẩn đề kháng với vancomycin khi MIC $\geq$ 16 μ g/mL với *S. aureus* và $\geq$ 32 mg/L với CNS. Sự hình thành các đột biến ngẫu nhiên đóng vai trò quan trọng cho sự xuất hiện các chủng vi khuẩn kháng thuốc. Trong trường hợp tụ cầu khuẩn kháng trung gian với vancomycin, một số nghiên cứu trước đây cho thấy có sự hình thành và tích lũy các đột biến trên nhiều gen liên quan đến các con đường điều hòa khác nhau của vi khuẩn (Hiramatsu *et al.*, 2014). Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích các đặc điểm kháng thuốc và xác định các đột biến có thể liên quan tới tính kháng trung gian với vancomycin ở hai chủng vi khuẩn *S. aureus* và *S. haemolyticus* phân lập từ bệnh nhân tại Bệnh viện Quân y 7A.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thu nhận và tái định danh chủng vi khuẩn

Tụ cầu khuẩn kháng methicillin, bao gồm *S. aureus* và các vi khuẩn thuộc nhóm tụ cầu không có enzyme coagulase (coagulase-negative staphylococci - CNS) được thu nhận từ Khoa Xét nghiệm - Bệnh viện quân Y 7A, Khoa Vi sinh - Bệnh viện Đại học Y Dược Tp.HCM và Khoa Kiểm soát nhiễm khuẩn - Bệnh viện Hùng Vương trong thời gian từ tháng 1/2018 đến tháng 4/2019. Các chủng vi khuẩn sau khi thu nhận được nuôi cấy trên môi trường thạch Brain Heart Infusion (BHI). Khuẩn lạc đơn, thuần được định danh bằng bộ kit API Staph (bioMérieux) và thực hiện kháng sinh đồ xác định đặc điểm kháng kháng sinh.

Đánh giá đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn

Kháng sinh đồ của các chủng vi khuẩn thu nhận được xác định bằng phương pháp đặt đĩa giấy kháng sinh. Đĩa giấy kháng sinh sử dụng bao gồm: penicillin (10 U), cefoxitin (30 μ g), clindamycin (2 μ g), erythromycin (15 μ g), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) (1.25/23.75 μ g) và linezolid (30 μ g). Độ nhạy cảm với vancomycin trên các chủng vi khuẩn thu nhận được xác định bằng cách đo giá trị MIC với vancomycin theo phương pháp vi pha loãng nồng độ thuốc (micro-dilution). Giá trị MIC của vancomycin và teicoplanin trên hai chủng được xác định kháng trung gian với vancomycin được xác định thêm bằng phương pháp E-test. MIC với các nhóm thuốc kháng sinh khác nhau của hai chủng kháng trung gian với vancomycin được đánh giá bằng phương pháp vi pha loãng sử dụng đĩa kháng sinh khô MIC dry plate (Eiken Chemical Co., Japan). Kết quả kháng sinh đồ được xác định theo hướng dẫn của CLSI - M100, 2018.

Tách chiết DNA bộ gen vi khuẩn

Hai chủng vi khuẩn *S. aureus* và *S. haemolyticus* kháng trung gian với vancomycin được nuôi tăng sinh qua đêm trong 10 mL môi trường giàu dinh dưỡng BHI. Dịch tăng sinh được sử dụng để tách chiết DNA tổng số dùng cho giải trình tự bộ gen. Quy trình tách chiết DNA gồm các bước chính: Thu nhận sinh khối và ly giải vách tế bào trong đệm Tris-NaCl-EDTA, bổ sung 2 μ L Lysostaphin (10 mg/mL) và ủ ở 37°C trong 60 phút. Biến tính và loại protein tế bào trong dịch sau khi ly giải bằng hỗn hợp 0.25 EDTA - 50 mM Tris và SDS 10%, ở 60°C trong 10 phút. Sau đó, ly tâm tốc độ tối đa trong 10 phút để tủa và loại protein, thu dịch nổi chứa nucleic acid. RNA được loại bỏ bằng xử lý với 1 μ L enzyme RNase (10 mg/mL), ủ ở 37°C, 30 phút. DNA được tinh sạch bằng phương pháp tủa với phenol-chloroform. Sau cùng DNA được rửa 2 lần bằng ethanol 70% lạnh và bảo quản trong 50 μ L đệm 1/10 TE ở -20°C. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA sau tách chiết được đo bằng máy đo quang phổ Nanodrop One (Thermo Scientific).

Giải trình tự bộ gen vi khuẩn

Trình tự DNA bộ gen của *S. aureus* và *S. haemolyticus* kháng trung gian với vancomycin được phân tích tại Bộ môn Di truyền, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp.HCM. Trình tự DNA được phân tích bằng máy giải trình tự Illumina MiniSeq sequencer. Trình tự library được chuẩn bị sử dụng Nextera XT library preparation kit. Chú giải gen được xác định dựa trên so sánh với các gen đã biết trên cơ sở dữ liệu pan-genome SEED database và RAST (Rapid Annotations using Subsystem Technology) (Overbeek *et al.*, 2014). Trình tự lắp ráp (assemble sequences) bộ gen của hai chủng *S. aureus* và *S. haemolyticus* kháng trung gian với vancomycin được đăng ký trên cơ sở dữ liệu DDBJ/ENA/GenBank với mã số tương ứng: JABUNX000000000 (*S. aureus*) và JABUNY000000000 (*S. haemolyticus*). Các gen kháng thuốc được xác định bằng chương trình ARIBA (Antimicrobial Resistance Identification By Assembly) (Hunt *et al.*, 2017). Đột biến gen liên quan tới tính kháng trung gian với vancomycin được xác định bằng cách so sánh trình tự các gen mục tiêu của hai chủng kháng trung gian với trình tự của chủng chuẩn nhạy cảm với vancomycin là *S. aureus* NCTC 8325 (mã số gen bank NC_007795) và *S. haemolyticus* JCSC 1435 (mã số gen bank NC_007795).

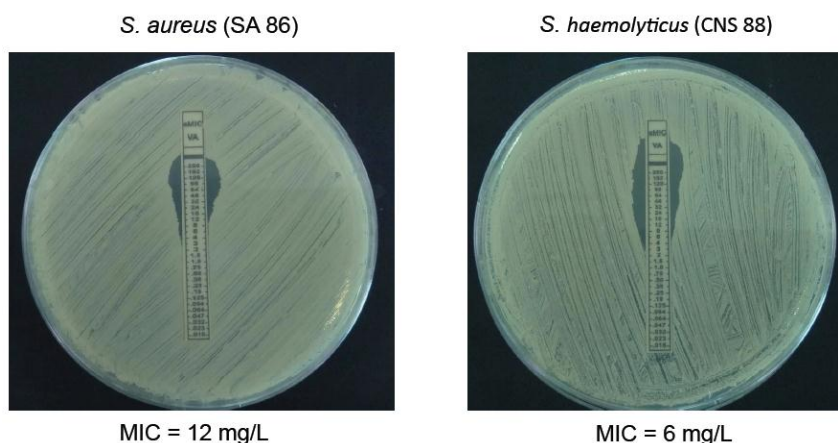
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Định danh và đặc điểm kháng kháng sinh của hai chủng vi khuẩn kháng trung gian với vancomycin

Chúng tôi đã thu nhận được 104 chủng *S. aureus* và CNS kháng methicillin. Sau khi tái định danh và kiểm tra kháng sinh đồ, 98/104 chủng được xác định kháng beta-lactam (penicillin và cefoxitin); trong đó có 80 chủng là *S. aureus* (81.6%), 07 chủng *S. wneri* (7.2%), 04 chủng *S. epidermidis* (4.1%), 04 chủng *S. haemolyticus* (4.1%),

01 chủng *S. cohnii* (1%), 01 chủng *S. saprophyticus* (1%) và 01 chủng *S. sciuri* (1%). Kết quả PCR khẳng định các chủng này đều mang gen *mecA* mã hóa cho protein gắn penicillin PBP2a gây ra tính kháng methicillin và các beta-lactam khác. Phân tích kháng sinh đồ trên các chủng này cho thấy: 82.7% chủng kháng Clindamycin; 81.6% chủng kháng Erythromycin; 6.2% chủng kháng sulfamethoxazole /Trimethoprim (SXT); 2% chủng kháng Linezolid. Đặc biệt, chúng tôi ghi nhận được 02 chủng kháng trung gian với vancomycin (2%) thu nhận từ Khoa Xét nghiệm - Bệnh viện Quân y 7A. Kết quả định danh bằng bộ kit API Staph và phân tích trình tự bộ gen xác định hai chủng này là *S. aureus* (kí hiệu SA 86) và *S. haemolyticus* (kí hiệu CNS 88). MIC của vancomycin trên hai chủng này lần lượt là 12 mg/L (SA 86) và 6 mg/L (CNS 88) (Hình 1). Hai chủng này còn nhạy cảm với teicoplanin (MIC = 0.125 mg/L và 2 mg/L tương ứng).

Ngoài ra, chúng tôi ghi nhận hai chủng này kháng đồng thời với nhiều loại kháng sinh khác nhau. Đặc điểm kháng kháng sinh của hai chủng vi khuẩn được trình bày trong Bảng 1.



Hình 1. E-test xác định MIC của vancomycin trên hai chủng *S. aureus* (SA 86) và *S. haemolyticus* (CNS 88)

Bảng 1. MIC (mg/L) với các loại thuốc kháng sinh khác nhau của hai chủng *S. aureus* và *S. haemolyticus* kháng trung gian với Vancomycin

Kháng sinh		MIC (mg/L)	
	Viết tắt	<i>S. aureus</i> (SA 86)	<i>S. haemolyticus</i> (CNS 88)
Oxacillin	MPIP	R (>4)	R (>4)
Ampicillin	ABPC	R (16)	R (>16)
Cefazolin	CEZ	R (>16)	R (>16)
Cefmetazole	CMZ	R (16)	R (>32)
Flomoxef sodium	FMOX	S (8)	S (16)
Imipenem	IPM	S (<0.25)	R (>8)
Gentamycin	GM	S (4)	R (>8)
Abekacin	ABK	S (4)	S (4)
Minocycline	MINO	S (4)	S (<2)
Erythromycin	EM	S (0.5)	R (>4)
Clindamycin	CLDM	I (1)	R (>2)
Vancomycin	VCM	I (12)	I (6)
Teicoplanin	TEIC	S (0.125)	S (2)
Linezolid	LZD	S (2)	S (1)
Fosfomycin	FOM	R (64)	R (64)
Levofloxacin	LVFX	R (>4)	R (>4)
Cefoxitin	CFX	R (>16)	R (>16)
Sulfamethoxazole - Trimethoprim	ST	R (>38/2)	R (>38/2)
Rifampicin	RIF	S (0.125)	R (>32)

Ghi chú: R (resistant) - Kháng; S (susceptible) - Nhạy cảm

Phân tích đột biến trên các gen liên quan tới tính kháng trung gian với vancomycin ở hai chủng vi khuẩn thu nhận

Phân tích trình tự DNA bộ gen của hai chủng vi khuẩn không thấy sự hiện diện của gen gây ra tính kháng với vancomycin (*van* gen) (Bảng 3). Nghiên cứu trước đây cho thấy ở các chủng kháng trung gian có sự thay đổi về đặc điểm cấu trúc ở thành tế bào và các đặc điểm chuyển hóa của vi khuẩn. Phân tích đặc điểm kiểu gen cho thấy sự hình thành các đột biến trên một số gen thuộc hệ thống điều hòa hai thành phần (two component system - TCS) ở vi khuẩn liên quan đến tính thấm của màng và chuyển hóa thành tế bào (*walKR*); tính kháng với các peptide kháng khuẩn, độc lực và đáp ứng lại với stress oxy hóa (*graSR* và *lytSR*); hệ thống điều hòa trực tiếp liên quan tới tính kháng vancomycin (*vraSR*) hay gen *rpoB* mã hóa cho tổng hợp tiểu phần beta của enzyme RNA polymerase vi khuẩn (Hiramatsu *et al.*, 2014). Kết quả phân tích đột biến trên các gen này ở hai chủng vi khuẩn phân lập được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Đột biến trên các gen ở hai chủng *S. aureus* và *S. haemolyticus* kháng trung gian với vancomycin

Protein	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
VraR	D59E	-
VraS	-	-
GraR	Q148D	-
GraS	F26L, L59I	K149T
WalR	-	-
WalK	-	V404A
LytR	T192A	-
LytS	-	-
RpoB	-	D471E, I527M, S532N, S796A

Ghi chú: - Không thay đổi

Trên chủng *S. haemolyticus* chúng tôi ghi nhận sự biến đổi của 4 acid amin D471E, I527M, S532N và S796A ở tiểu phần beta của enzyme RNA polymerase (RpoB). Không ghi nhận thấy đột biến của RpoB trên chủng *S. aureus* SA86. Các đột biến này có thể liên quan trực tiếp tới sự gia tăng tính kháng với rifampicin trên chủng này (MIC > 32 mg/L, Bảng 1).

Sự hiện diện của nhiều gen kháng thuốc ở hai chủng vi khuẩn kháng trung gian với vancomycin

Phân tích trình tự bộ gen của hai chủng vi khuẩn cho thấy sự hiện diện của các gen kháng thuốc tương ứng với kiểu hình kháng (Bảng 3).

Bảng 3. Các gen kháng thuốc ở hai chủng *S. aureus* và *S. haemolyticus* kháng trung gian với vancomycin được xác định bằng giải trình tự bộ gen

Nhóm kháng sinh	Gen kháng	
	<i>S. aureus</i> (SA 86)	<i>S. haemolyticus</i> (CNS 88)
Aminocoumarin	<i>alaS</i>	<i>alaS</i>
Aminoglycoside	-	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>
Beta-lactam	<i>mecA</i> ; <i>mecR1</i>	<i>mecA</i> ; <i>mecI</i> ; <i>blaZ</i>
Diaminopyrimidine	<i>dfcC</i>	<i>dfcC</i> ; <i>dfcG</i>
Fluoroquinolone	<i>mfd</i>	<i>mfd</i>
Isoniazid	<i>fabI</i>	<i>fabI</i>
Lincosamide	<i>ermB</i> ; <i>cfrA</i>	<i>ermC</i> ; <i>cfrA</i>
Linezolid	<i>cfrA</i>	<i>cfrA</i>
Macrolide	<i>ermB</i>	<i>ermC</i> ; <i>mphC</i> ; <i>cfrA</i>
Mupirocin	<i>ileS</i>	<i>ileS</i>
Peptide	<i>mprF</i>	-
Phenicol	<i>cfrA</i>	<i>cfrA</i>
Streptogramin	<i>ermB</i> ; <i>cfrA</i>	<i>ermC</i> ; <i>cfrA</i>
Triclosan	<i>fabI</i>	<i>fabI</i>
Trimethoprim	<i>dfcC</i>	-

Ghi chú: - Không phát hiện

Đáng lưu ý, cả hai chủng vi khuẩn đều mang gen *cfr* gây ra tính kháng với linezolid. Linezolid được sử dụng trong điều trị tụ cầu hay các liên cầu đường ruột (enterococci) kháng methicillin, kháng hay thất bại trong điều trị với vancomycin. Mặc dù hai chủng vi khuẩn trong nghiên cứu có kiểu hình nhạy cảm với linezolid (MIC = 2 mg/L và MIC = 1 mg/L trên *S. aureus* và *S. haemolyticus* tương ứng, Bảng 1). Điều này có thể giải thích do sự hiện diện đơn lẻ của gen *cfr* chỉ làm gia tăng nhẹ MIC của kháng sinh này. MIC của linezolid tăng cao khi có sự hiện diện của gen *cfr* kết hợp với một số đột biến trên vùng 23S rRNA và 50S ribosomal protein vì khuẩn là đích tác động của thuốc (Chastre *et al.*, 2014). Phân tích trình tự trên các gen này cho thấy hai chủng vi khuẩn không mang các đột biến làm gia tăng tính kháng với linezolid. Gen *cfr* có khả năng lan truyền cao giữa các nhóm tụ cầu khuẩn với nhau. Gần đây, chúng tôi cũng đã ghi nhận các chủng tụ cầu khuẩn kháng mạnh với linezolid có mang gen kháng *cfr* và các đột biến tại đích tác động của thuốc (Nguyen *et al.*, 2020). Sự xuất hiện của các chủng tụ cầu khuẩn kháng trung gian với vancomycin và mang gen kháng với linezolid là cảnh báo nghiêm trọng về sự hạn chế và khả năng thất bại trong điều trị các tụ cầu khuẩn siêu kháng thuốc này.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi mô tả đặc điểm kiểu gen kháng thuốc của hai chủng *S. aureus* và *S. haemolyticus* kháng trung gian với vancomycin được phân lập từ bệnh nhân tại Bệnh viện Quân y 7A. Bằng phương pháp giải trình tự toàn bộ gen, chúng tôi xác định sự hiện diện của các biến thể với sự thay đổi trình tự amino acid ở các gen điều hòa *vraSR*, *graSR*, *lytSR*, *walkR* liên quan đến tính kháng vancomycin, tính kháng với các peptide kháng khuẩn và chuyển hóa thành tế bào trên 2 chủng vi khuẩn này. Bên cạnh các đột biến gây ra tính kháng trung gian với vancomycin, sự hiện diện của nhiều gen kháng với các nhóm thuốc kháng sinh phổ biến khác cũng được ghi nhận. Việc sử dụng kháng sinh đại trà và thiếu kiểm soát góp phần làm gia tăng xuất hiện các đột biến gây ra tính kháng thuốc.

Lời cảm ơn: Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn: Khoa Xét nghiệm - Bệnh viện Quân Y 7A; Khoa Vi sinh - Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh và Khoa Kiểm soát nhiễm khuẩn - Bệnh viện Hùng Vương đã hỗ trợ cung cấp mẫu vi khuẩn cho nghiên cứu. Đề tài được sự tài trợ bởi Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chastre J, Blasi F, Masterton RG, Rello J, Torres A, Welte T (2014). European perspective and update on the management of nosocomial pneumonia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after more than 10 years of experience with linezolid. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 20 Suppl 4:19-36.
- Hiramatsu K, Kayayama Y, Matsuo M, *et al.* (2014). Vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist* 2(4):213-224.
- Hunt MMAE, Sánchez-Busó L, Page AJ, Parkhill J, Keane JA, Harris SR (2017). ARIBA: Rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microbial Genom*.
- Nguyen LTT, Nguyen KNT, Le PNTA, *et al.* (2020). The emergence of plasmid-borne *cfr*-mediated linezolid resistant-staphylococci in Vietnam. *J Glob Antimicrob Resist* 2020; S2213-7165(20)30102-8.
- Overbeek ROR, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42:D206-14.
- Périchon B, Courvalin P (2009). VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53(11):4580-4587.
- Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC (2008). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*; 46: 668-74.

GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF THE TWO VANCOMYCIN INTERMEDIATE-RESISTANT *S. AUREUS* AND *S. HAEMOLYTICUS* ISOLATED FROM 7A MILITARY HOSPITAL

Nguyen Thi Le Thuy^{1,*}, Nguyen Thi Khanh Ngau^{1,2}, Thuong Thi Thu Thuy¹, Nguyen Ngoc Le³, Nguyen Manh Kien³, Nguyen Hoang Thien Phuc⁴, Nguyen Thuy Vy⁴, Pham Thi Kim Tram¹, Le Quang Tri³, Morikawa Kazuya⁵, Nguyen Dang Quan¹

¹ Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

² University of Science - Vietnam National University Ho Chi Minh City

³ 7A Military Hospital

⁴ Department of Genetics, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science - Vietnam National University Ho Chi Minh City

⁵ University of Tsukuba, Japan

SUMMARY

Methicillin-resistant staphylococci (including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA and methicillin-resistant coagulase negative staphylococci - MRCNS) have been recognized as one of the major concerns of bacterial infection in the hospital and the community, leading more difficulties for the treatment. Vancomycin is an effective drug and is considered as the "last resort" for the treatment of MRSA and MRCNS. However, there is an increasing of treatment failure to this group of bacteria with vancomycin due to the emergence of intermediate-resistant and resistant strains. In this study, we describe the genotypic characterization of the two vancomycin intermediate-resistant *S. aureus* and *S. haemolyticus* isolated from patients at 7A Military Hospital. The vancomycin minimum inhibitory concentrations (MIC) of the two isolates were 12 mg/L and 6 mg/L, respectively. Whole genome sequencing identified the presence of variants with amino acid sequence changes in the regulator genes *vraSR*, *graSR*, *lytSR*, *walkR* involved in vancomycin resistance, resistance to antibacterial peptides and cell wall metabolism on these two strains. In addition to the mutations that might cause vancomycin intermediate-resistance, the presence of multiple resistance genes to common antibiotics was remarkable. The massive imprudent usage of antibiotics and lack of control contributes to the emergence of mutations causing resistance.

Keywords: Staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, vancomycin intermediate-resistance.

* Author for correspondence: Tel: +84-983397430; Email: lenacns2005@gmail.com