

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA VI KHUẨN *Staphylococcus* COAGULASE ÂM TÍNH TRÊN DA NGƯỜI KHỎE MẠNH

Nguyễn Thị Châu Anh¹, Nguyễn Thị Minh Nga², Nguyễn Đức Huy², Dương Thị Ngọc Mai¹, Nguyễn Thị Khánh Linh¹, Nguyễn Thị Tuyên¹, Đinh Thị Hải¹, Hoàng Thị Minh Ngọc¹, Trần Đình Bình¹

¹Trường Đại học Y - Dược Huế, Đại học Huế

²Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Staphylococcus coagulase âm tính (CoNS) được xem là nhóm vi sinh vật không gây bệnh cư trú trên da người, có tác dụng ức chế nhóm vi sinh gây bệnh như *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* kể cả nhóm kháng kháng sinh nhờ khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng khuẩn bacteriocin. Trong nghiên cứu này, các *Staphylococcus coagulase* âm tính tiềm năng đối kháng vi khuẩn gây bệnh được phân lập từ hệ vi sinh vật trên da người khỏe mạnh trong độ tuổi từ 18-65. Kết quả phân lập được 1 chủng tiềm năng được kí hiệu 128-XN2B 11.2 có khả năng sinh tổng hợp các chất đối kháng *E. coli* và *S. aureus*. Phân tích trình tự nucleotide vùng 16S rDNA cho thấy chủng 128-XN2B 11.2 tương đồng cao với *Staphylococcus hominis* là loài vi khuẩn tiềm năng trong việc tạo ra các bacteriocin và các chất kháng khuẩn đối kháng vi sinh vật gây hại ký sinh trên da người.

Từ khóa: *Staphylococcus hominis*, CoNS, đối kháng, da người khỏe mạnh.

MỞ ĐẦU

Hệ vi sinh vật ở con người là một yếu tố quan trọng và có tác động lớn đến sức khỏe cũng như cuộc sống của mỗi người. Trong các nhóm vi sinh vật trên cơ thể người thì các vi khuẩn chí là nhóm vi khuẩn rất đa dạng và có thể đem lại một số lợi ích cho sức khỏe. Chúng có khả năng sản sinh nhiều hoạt chất kháng khuẩn như lactic acid, bacteriocin tạo môi trường bất lợi, từ đó ức chế sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh. Trong số các vi khuẩn được tìm thấy trên da, các chủng tụ cầu chiếm đa số và đặc biệt là nhóm vi khuẩn tụ cầu không có khả năng sinh coagulase (Negative Coagulase *Staphylococcus*: CoNS). Những tụ cầu coagulase âm tính này được xem là các vi khuẩn không gây bệnh và được chứng minh là có thể tiết ra một số bacteriocin gọi là Staphylococcin có khả năng ức chế hiệu quả với nhiều vi khuẩn gây bệnh hay gặp như *Staphylococcus aureus*, thậm chí kể cả *S. aureus* kháng methicillin (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Nakatsuji *et al.*, 2017).

Bacteriocin có bản chất là peptide kháng khuẩn sinh ra bởi vi khuẩn để chống lại vi khuẩn khác. Đại đa số các loài vi khuẩn đường như có thể sản xuất ít nhất một bacteriocin, hầu hết trong số đó chưa được biết. Bacteriocin thể hiện hoạt tính kháng khuẩn và cơ chế miễn dịch đặc hiệu đối với các chủng có quan hệ gần gũi với vi khuẩn sản xuất (Darbandi *et al.*, 2022). Trong tình hình kháng thuốc đang trở thành nguy cơ nặng nề cho y học, việc xác định được các bacteriocin có hoạt độ kháng khuẩn cao từ các chủng vi khuẩn tụ cầu không gây bệnh trên da là cần thiết nhằm đưa ra giải pháp hữu hiệu thay thế kháng sinh trong điều trị nhiễm trùng. Vì vậy, hướng nghiên cứu tìm kiếm vi sinh vật không gây hại cho con người đồng thời sinh tổng hợp các hợp chất đối kháng vi sinh vật gây hại là hướng đi tiềm năng tạo ra các sản phẩm hỗ trợ trong điều trị nhiễm trùng trong y học.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phân lập các chủng vi khuẩn coagulase âm tính trên da người

Lấy mẫu nghiệm phết trên da của 48 người khỏe mạnh từ 18-65 tuổi (gồm 41 nữ, 7 nam) tại Khoa Vi sinh - Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế, mẫu sau khi lấy đặt vào môi trường vận chuyển và được chuyển đến phòng thí nghiệm trong vòng 12 giờ ở 4°C. Mẫu nghiệm phết trên da được lấy bằng cách sử dụng que tăm bông vô trùng có nhúng nước muối vô trùng, phết các vị trí trên da của mỗi người tham gia nghiên cứu gồm: vùng sau tai, vùng lòng bàn tay, kẽ ngón tay, đầu móng tay, đầu ngón tay, bên cánh mũi, nếp gấp cổ và vùng giữa các ngón chân. Mẫu nghiệm được tiến hành cấy lên đĩa môi trường thạch dinh dưỡng và ủ 37°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc được tiến hành nhuộm Gram nhằm xác định cầu khuẩn Gram dương. Sau đó, xét nghiệm catalase (+) được tiến hành để phát hiện *Staphylococcus spp.* Sau cùng, vi khuẩn CoNS cần tìm được xác định dựa vào xét nghiệm coagulase ống nghiệm (-) (Sadiya *et al.*, 2019).

Khảo sát khả năng đối kháng từ các chủng coagulase âm tính phân lập

Các chủng CoNS phân lập được từ mẫu nghiệm phết trên da người khỏe mạnh sẽ được xác định khả năng đối kháng vi sinh vật gây bệnh thông qua các chủng chỉ thị bao gồm: *S. aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 và *E. coli* ATCC 25922 bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch (O'Sullivan *et al.*, 2019);

(Otto, 2010). Khuẩn lạc đơn được nuôi cấy trên môi trường BHI (Merck, Đức), trong ống nghiệm với thể tích 5 mL trong 24 giờ ở 37°C. Sau đó, dịch nuôi cấy được thu hồi bằng ly tâm 10.000v/phút ở 10 phút và loại bỏ tế bào. Dịch nuôi cấy sau loại bỏ tế bào được điều chỉnh pH đến giá trị 6,9-7,2 bằng NaOH 1M và bảo quản lạnh ở 4°C. 50 µl dung dịch nuôi cấy đã loại bỏ tế bào được đưa vào mỗi giếng của đĩa thạch đã được cấy trải đồng vi khuẩn chỉ thị. Tiến hành ủ mẫu ở 4°C trong 1 giờ cho dung dịch trong giếng khuếch tán và tiếp tục ủ ở 37°C, 24 giờ. Quan sát và đo kích thước vòng vô khuẩn quanh giếng để đánh giá khả năng kháng khuẩn (O'Sullivan *et al.*, 2019); (Nakamura *et al.*, 1983).

Định danh phân tử các chủng phân lập

Các chủng vi khuẩn coagulase âm tính đối kháng vi khuẩn chỉ thị được nuôi cấy trong ống nghiệm chứa 5 mL môi trường Luria-Bertani và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 24h. Sinh khối tế bào được thu nhận bằng ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. DNA tổng số được tách chiết bằng bộ KIT DNA Genomic ToPURE (ABT, Việt Nam) theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Trình tự gen 16S rDNA của chủng vi khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng các đoạn mồi 27F: (5' AGATTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R: (5'-GGTTACCTT GTTACGACTT-3'). Thành phần phản ứng PCR bao gồm 30 µl 2x Go Taq® Green Master Mix (Promega, USA), 2,5 µl DNA, 5 µl mỗi nồng độ 10 µM và 17,5 µl nước cất vô trùng. Chu trình PCR được thực hiện với chu trình nhiệt như sau ở 95°C/ 10 phút, sau đó là 30 chu kỳ ở 94°C/ 1 phút, 53°C/ 30 giây và ở 72°C/ 1 phút và 1 chu kỳ ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm sau khuếch đại PCR được kiểm tra điện di trên gel agarose TAE 1% (w/v) và được nhuộm bằng thuốc nhuộm SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Canada). Các sản phẩm PCR được khuếch đại, gửi đến công ty dịch vụ giải trình tự (Firstbase, Malaysia) để giải trình tự.

Các trình tự nucleotide vùng 16s rDNA được xử lý bằng để thu nhận các trình đồng thuận cho từng phân đoạn bằng phần mềm BioEdit v7.0.5 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) (Hall, 1999). Trình tự nucleotide vùng 16S rDNA được so sánh với các trình tự tương ứng trên GenBank (NCBI) bằng công cụ Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) để căn chỉnh bằng thuật toán MUSCLE bằng phần mềm MEGA 7.0. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa theo thuật toán Maximum Likelihood kết hợp phần mềm IQ - TREE v2.1.3 (Minh *et al.*, 2020) với giá trị bootstrap 1000 và xác suất hậu nghiệm aBayesian. Cây phát sinh loài được hiển thị bằng phần mềm Interactive Tree of Life (ITOL) v6 (Letunic, Bork, 2021).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập thư viện *Staphylococcus coagulase* âm tính

Từ kết quả nuôi cấy các mẫu nghiệm dịch phết da từ người khỏe mạnh thu thập được 126 chủng vi khuẩn *Staphylococcus coagulase* âm tính được phân lập dựa trên các đặc điểm hình thái (khuẩn lạc tròn, bờ trơn, màu trắng đục, Gram dương), đặc điểm hóa sinh (catalase và coagulase âm tính), cho thấy *Staphylococcus coagulase* âm tính chiếm tỷ lệ 97,14% trên tổng số vi sinh vật xuất hiện trên đĩa môi trường nuôi cấy (Bảng 1). Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu phân lập *Staphylococcus coagulase* âm tính từ mẫu phết da của người khỏe mạnh (Otto, 2010; Goering *et al.*, 2019).

Bảng 1. Phân bố các nhóm vi khuẩn phân lập trên da

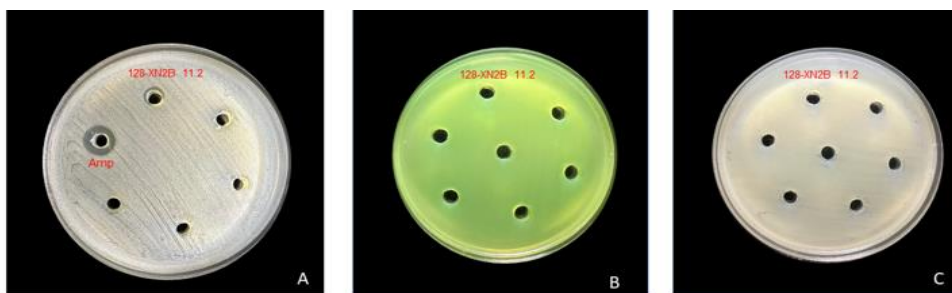
STT	Nhóm vi khuẩn	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	02	1,51%
2	<i>Staphylococcus coagulase</i> âm tính (CoNS)	126	95,46%
3	Trực khuẩn	03	2,27%
4	Nấm	01	0,76%
Tổng		132	100%

Xác định khả năng đối kháng từ thư viện *Staphylococcus coagulase* âm tính

Tất cả 126 chủng vi khuẩn *Staphylococcus coagulase* âm tính được kiểm tra khả năng đối kháng bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch và được trình bày ở Bảng 2. Qua quan sát vòng kháng khuẩn xuất hiện trên đĩa thạch có 01 chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính ức chế *S. aureus*. Tuy nhiên, sự đối kháng với *Escherichia coli* ATCC 25922 và *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 không rõ ràng. Chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính được ký hiệu là 128-XN2B 11.2 tạo đường kính vòng vô khuẩn đối kháng *S. aureus* với kích thước là 8 mm (Bảng 2 và Hình 1).

Bảng 2. Tỷ lệ các chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính có hoạt tính đối kháng

STT	<i>Staphylococcus coagulase</i> âm tính	Số lượng	Tỷ lệ (%)
1	Hoạt tính đối kháng	01	0,8 %
2	Không có hoạt tính đối kháng	125	99,2 %
Tổng cộng		126	100%



Hình 1. Khả năng đối kháng chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính

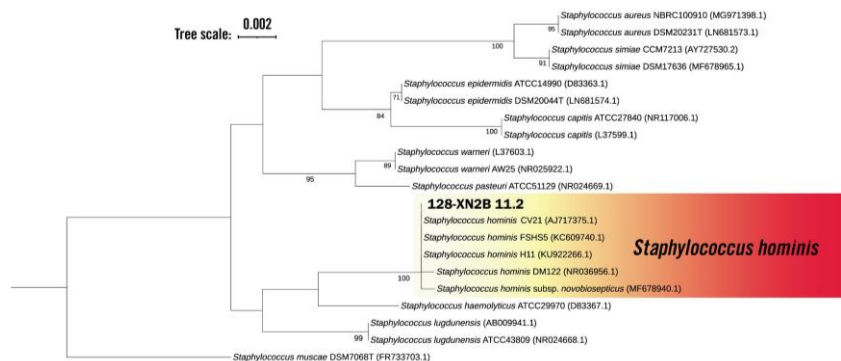
A. Sự đối kháng của chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính với *S. aureus* ATCC 25923, B. Sự đối kháng của chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính với *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, C. Sự đối kháng của chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính với *Escherichia coli* ATCC 25922

Định danh phân tử chủng *Staphylococcus coagulase* âm tính

Chủng vi khuẩn 128-XN2B 11.2 được tách chiết DNA tổng số và khuếch đại trình tự nucleotide vùng 16S rDNA thu được sản phẩm PCR với kích thước khoảng 1,4 kb. Sau khi giải trình tự nucleotide sản phẩm PCR đã thu được đoạn DNA dài 1407 bp và sử dụng để so sánh với các trình tự nucleotide tham chiếu của các chủng chuẩn trên Genbank bằng công cụ BLAST. Kết quả so sánh cho thấy chủng 128-XN2B 11.2 tương đồng cao với chủng *Staphylococcus hominis* DM122 ATCC 27844 (NR036956) và chủng *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* ATCC 700236 (MF678940) với tỷ lệ tương đồng 99,79% và 99,92%. Bên cạnh đó chủng 128-XN2B 11.2 cũng tương đồng 100% với các chủng phân lập ở các nghiên cứu khác bao gồm: *St. hominis* CV21, *S. hominis* FSHS5, *S. hominis* H11 (Bảng 3).

Bảng 3. Mức độ tương đồng và bao phủ vùng 16S rDNA của chủng 128-XN2B 11.2 với chủng chuẩn trên Genbank

STT	Loài	Mã số Genbank	Kích thước vùng (bp)	Tỷ lệ bao phủ (%)	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	<i>S. hominis</i> CV21	AJ717375	1529	100	100
2	<i>S. hominis</i> FSHS5	KC609740	1474	100	100
3	<i>S. hominis</i> H11	KU922266	1426	99	100
4	<i>S. hominis</i> DM122	NR036956	1544	100	99,79
5	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	MF678940	1283	100	99,92



Hình 2. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự nucleotide 16S rDNA của chủng phân lập và các chủng tham chiếu cho thấy vị trí của các chủng trong chi *Staphylococcus*.

Kết quả ở hình 2, cho thấy chủng 128-XN2B 11.2 tạo thành nhóm riêng biệt với các chủng thuộc loài *S. hominis* khi so sánh trình tự 16S rDNA. Như vậy, kết hợp với các đặc điểm hình thái, chủng 128-XN2B 11.2 được kết luận là *S. hominis*. Báo cáo của Becker và đồng tác giả (2014) mô tả *S. hominis* là tụ cầu khuẩn âm tính coagulase (loại CoNS) có trong hệ vi sinh vật ở da người khỏe mạnh (Becker *et al.*, 2014) (Kloos, Schleifer, 1975). Nghiên cứu của O'Sullivan và đồng tác giả (2019) ghi nhận về phân lập chủng *S. hominis* âm tính với coagulase từ da người khỏe mạnh đồng thời sinh tổng hợp chất kháng khuẩn từ đó ức chế vi khuẩn Gram dương như *Propionibacteria acnes* (hay *Cutibacteria acnes*), *Staphylococcus epidermidis* và *S. aureus* kháng methicillin (O'Sullivan *et al.*, 2019). Nghiên cứu của Nakatsuji và đồng tác giả (2017) cũng phát hiện *S. hominis* sinh tổng hợp các phân tử kháng khuẩn mạnh được gọi là lantibameli khi kết hợp với LL-37, một phân tử kháng khuẩn được tạo ra bởi hệ thống miễn dịch của con người sẽ ức chế tốt *S. aureus* (Nakatsuji *et al.*, 2017).

KẾT LUẬN

Từ thư viện 126 chủng vi khuẩn *Staphylococcus coagulase* âm tính phân lập trên da người khỏe mạnh đã chọn ra được chủng có khả năng đối kháng với *S. aureus*. Kết hợp dữ liệu định danh phân tử và đặc điểm hình thái, sinh hóa cho thấy chủng 128-XN2B 11.2 phân lập thuộc loài *S. hominis*. Chủng phân lập có tiềm năng trong các nghiên cứu tiếp theo nhằm xác định chính xác các hoạt chất kháng khuẩn, từ đó tạo cơ sở tạo ra các chế phẩm hỗ trợ chống nhiễm trùng do vi khuẩn *S. aureus*.

Lời cảm ơn: Đây là kết quả của Đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ mã số B2023-DHH-09, xin cảm ơn các thành viên nghiên cứu của đề tài và sự hỗ trợ của Ban khoa học công nghệ Đại học Huế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Becker K, Heilmann C, Peters G (2014) Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 27: (4) 870-926.
- Darbandi A, Asadi A, Mahdizade AM, Ohadi E, Talebi M, Halaj ZM, Kakanj M (2022) Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *J Clin Labo Anal* 36: (1).
- Goering R, Dockrell HM, Zuckerman M, Chiodini PL (2019) *Mims' Medical Microbiology and Immunology*. Elsevier.
- Hall TA (1999) BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp* 41: 95-98.
- Kloos WE, Schleifer KH (1975) Isolation and characterization of staphylococci from human skin. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *Int J Syst Bacteriol* 25: 62-79.
- Letunic I, Bork P (2021) Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res* 49 (1) 293-296.
- Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, Lanfear R (2020) IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol* 37: (5) 1530-1534.
- Nakamura T, Yamazaki N, Taniguchi H, Fujimura S (1983) Production, purification, and properties of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* isolated from saliva. *Infect Imm* 39: (2) 609-614.
- Nakatsuji T, Chen TH, Narala S CK, Two AM, Yun T, Shafiq F, Kotol PF, Bouslimani A, Melnik AV, Latif H, Kim JN, Lockhart A, Artis K, David G, Taylor P, Streib J, Dorrestein PC, Grier A, Gill SR, Zengler K, Hata TR, Leung DY, Gallo RL (2017) Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Sci Transl Med* 9: (378).
- O'Sullivan JN, Rea MC, O'Connor PM, Hill C, Ross RP (2019) Human skin microbiota is a rich source of bacteriocin-producing staphylococci that kill human pathogens. *FEMS Microbiol Ecol* 95 (2) 1-10.
- Otto M (2010) Staphylococcus colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Rev Dermatol* 5: (2) 183-195.
- Sadiya MI, Ismail A, Sani MY, Muhammad A (2019) Isolation and characterization of *Staphylococcus species* from clinical samples obtained from some hospitals in Kano Metropolis, Nigeria. *ARC J Urol* 4: (3) 1-6.

STUDY ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVE STRAINS ON HEALTHY HUMAN SKIN

Nguyen Thi Chau Anh¹, Nguyen Thi Minh Nga², Nguyen Đức Huy², Dương Thi Ngọc Mai¹,
Nguyen Thi Khanh Linh¹, Nguyen Thi Tuyen¹, Dinh Thi Hai¹, Hoang Thi Minh Ngọc¹, Tran Dinh Binh^{1*}

¹Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

²Institute of Biotechnology, Hue University

SUMMARY

Coagulase-negative Staphylococcus (CoNS) are considered a group of non-pathogenic microorganisms that reside on human skin and have the ability to produce antibacterial substances (bacteriocin) to inhibit pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* or antibiotic-resistant microorganisms. In this study, potential strain Staphylococcus coagulase-negative which against pathogenic bacteria were isolated from the skin microbiota of healthy human aged 18-65 years. The results showed that 126 strains of CoNS were isolated from healthy human skin in which it found a *S. aureus* antagonistic 128-XN2B 11.2 strain. Nucleotide sequence analysis of the 16S rDNA region showed that strain 128-XN2B 11.2 was highly similar to *Staphylococcus hominis*, a potential bacterial strain in producing bacteriocins and potent antibacterial substances.

Keywords: *Staphylococcus hominis*, CoNS, antagonistic, healthy human skin.

* Author for correspondence: Tel: 0913363930; Email: tdbinh@huemed-univ.edu.vn