

# Đánh giá khả năng kháng *Staphylococcus aureus* kháng methicillin của pinostrobin từ cao chiết Trâm tròn (*Syzygium glomeratum*)

Mai Thị Ngọc Lan Thanh<sup>1\*</sup>, Hoàng Anh Hoàng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Y - Dược, Trường Đại học Thủ Dầu Một, 6 Trần Văn Ôn, phường Phú Hòa, TP Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 268 Lý Thường Kiệt, phường 14, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 6/10/2023; ngày chuyển phản biện 9/10/2023; ngày nhận phản biện 31/10/2023; ngày chấp nhận đăng 3/11/2023

## Tóm tắt:

Tụ cầu vàng kháng methicillin (MRSA), mầm bệnh phổ biến nhất trong môi trường bệnh viện và cộng đồng, có thể gây nhiễm trùng nghiêm trọng và thậm chí gây tử vong. Pinostrobin được tách chiết từ cao ethanol Trâm tròn có hoạt tính kháng MRSA. Nghiên cứu này thực hiện nhằm khảo sát khả năng kháng *Staphylococcus aureus* kháng MRSA từ tinh chất pinostrobin. Sử dụng phương pháp bàn cờ để xác định khả năng hợp lực của pinostrobin và vancomycin trong hoạt tính kháng MRSA. Kết quả xác định được pinostrobin có khả năng hợp lực với vancomycin kháng MRSA với chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn (FIC) = 0,5. Sử dụng phương pháp nhuộm với crystal violet để thử nghiệm khả năng ức chế hình thành biofilm của pinostrobin trên MRSA. Kết quả cho thấy, pinostrobin không có khả năng ức chế hình thành biofilm trên MRSA. Sử dụng phương pháp lai miễn dịch với kháng thể đơn dòng bất protein PBP2a cho thấy, pinostrobin ức chế sự biểu hiện của protein PBP2a trên MRSA. Pinostrobin được thu nhận từ chi Trâm, có khả năng kháng MRSA và khả năng hợp lực với vancomycin, bước đầu xác định đích tác động của pinostrobin trên MRSA là protein PBP2a.

**Từ khóa:** hoạt tính kháng khuẩn, pinostrobin, tụ cầu vàng kháng methicillin.

**Chỉ số phân loại:** 1.6, 3.5

## Evaluation of the ability of pinostrobin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from *Syzygium glomeratum* extract

Thi Ngọc Lan Thanh Mai<sup>1\*</sup>, Hoang Anh Hoang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Medical, Thu Dau Mot University, 6 Tran Van On Street, Phu Hoa Ward, Thu Dau Mot City, Binh Duong Province, Vietnam

<sup>2</sup>Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh University of Technology, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, 268 Ly Thuong Kiet Street, Ward 14, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 6 October 2023; revised 31 October 2023; accepted 3 November 2023

## Abstract:

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), the most common pathogen in hospital and community environments, can cause serious and even fatal infections. Pinostrobin is isolated from the ethanol extract of *Syzygium glomeratum*, which has anti-MRSA activity. This research was conducted with the purpose of evaluating the anti-MRSA activity of pinostrobin. The checkerboard method was used for the determination of synergism between pinostrobin and vancomycin in anti-MRSA activity. The results show that pinostrobin has the ability to synergise with vancomycin anti-MRSA through the fractional inhibitory concentration index FIC index equals 0.5. The crystal violet-based assay is used to evaluate the MRSA biofilm formation of pinostrobin. The results show that the pinostrobin did not cause inhibition of MRSA biofilm formation. Using the PBP2a latex agglutination test to determine the absence of PBP2a protein when MRSA was grown in culture medium-supplied pinostrobin shows that pinostrobin inhibited the expression of PBP2a protein in the cell wall of MRSA. Pinostrobin was purified from the *Syzygium* genus, which has the potency of anti-MRSA activity and the synergism with vancomycin, initially processing the inhibition of expression PBP2a protein in the cell wall of MRSA.

**Keywords:** anti-bacterial activity, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, pinostrobin.

**Classification numbers:** 1.6, 3.5

\*Tác giả liên hệ: Email: thanhmntl@tdmu.edu.vn

## 1. Đặt vấn đề

Các bệnh nhiễm khuẩn *Staphylococcus aureus* kháng MRSA rất khó điều trị, các bệnh nhiễm khuẩn liên quan là nhiễm trùng máu, nhiễm trùng phổi... do các yếu tố độc lực là vấn đề trong y tế toàn cầu hiện nay [1]. Ngoài ra, MRSA có hai cơ chế kháng kháng sinh phổ biến hiện nay đối với nhóm  $\beta$ -lactam là biểu hiện enzym  $\beta$ -lactamase và protein PBP2a [2]. Nghiên cứu tỷ lệ tử vong trong vòng 30 ngày đối với bệnh viêm phổi bệnh viện từ 18,7 đến 40,8% tại 10 nước châu Á, trong đó MRSA chiếm 82,1% trong tổng số các chủng *S. aureus* phân lập [3]. Năm 2017, Tổ chức Y tế thế giới (WHO) xác định các bệnh nhiễm MRSA là đối tượng ưu tiên nghiên cứu và phát triển các phương pháp điều trị mới [4].

Vancomycin là tiêu chuẩn vàng trong điều trị các bệnh có liên quan đến MRSA [5]. Chủng MRSA kháng vancomycin (VRSA) được báo cáo chiếm tỷ lệ 6,1% [6]. Trong khoảng 30 năm trở lại đây, các nghiên cứu mới trong việc tìm ra loại kháng sinh mới chưa thực sự thành công, các nghiên cứu dạng sửa đổi dựa vào khung nguyên bản của thuốc kháng sinh thế hệ cũ chiếm chủ yếu.

Dựa vào những lý do trên, nghiên cứu các nguồn kháng sinh mới hoặc các phương pháp mới để kiểm soát vi khuẩn kháng kháng sinh, đặc biệt dạng siêu kháng thuốc là cần thiết [7]. Trong các hướng nghiên cứu thuốc mới hiện nay thì khả năng kết hợp các hợp chất thực vật với các kháng sinh [8] hoặc kết hợp các hợp chất thực vật với nhau [9] đang được quan tâm nghiên cứu.

Cao chiết ethanol Trâm tròn cho hoạt tính kháng MRSA với giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) bằng 1 mg/ml [10-12], tinh chất pinostrobin được xem là tinh chất chính được tách chiết từ cao ethanol toàn phần với hiệu suất bằng  $12,79 \pm 0,21$  mg pinostrobin/1 g bột lá khô. Do đó, câu hỏi nghiên cứu được đặt ra là có hay không pinostrobin có liên quan đến khả năng kháng, khả năng hợp lực với kháng sinh vancomycin trên hoạt tính kháng MRSA của cao ethanol toàn phần Trâm tròn. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu xác định hoạt tính sinh học của pinostrobin trong phối hợp với vancomycin đối với *Staphylococcus aureus* kháng MRSA.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* kháng MRSA ATCC® 33591, chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* nhạy methicillin (MSSA) ATCC® 6538 được cung cấp bởi Microbiologics của Hoa Kỳ. Pinostrobin được tách chiết từ cao ethanol toàn phần Trâm tròn (*Syzygium glomeratum*) bộ phận làm cao gồm lá và cành non, được lưu trữ tại Khoa Y - Dược, Trường Đại học Thủ Dầu Một.

### 2.2. Phương pháp xác định hoạt tính kháng MRSA bằng phương pháp vi pha loãng

MIC là nồng độ thấp nhất ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn ở mức có thể quan sát được [13]. Phương pháp pha loãng dây nồng độ trên đĩa 96 giếng được thực hiện nhằm mục đích xác định MIC. Sử dụng đĩa nuôi cấy 96 giếng, mỗi giếng được bổ sung gồm các thành phần: 90  $\mu$ l môi trường lỏng Muller-Hinton (MHB), 10  $\mu$ l dịch vi khuẩn có nồng độ  $10^6$  CFU/ml, 100  $\mu$ l dung dịch pinostrobin được hòa tan trong DMSO 20%, thể tích cuối trong mỗi giếng là 200  $\mu$ l.

Trên đĩa 96 giếng, các giếng được bố trí theo sơ đồ thí nghiệm, dung dịch pinostrobin được pha loãng với độ pha loãng 2X thành một dãy từ 51,2  $\mu$ g/ml đến 1,6  $\mu$ g/ml. Các giếng đối chứng gồm: Giếng chỉ có môi trường Muller-Hinton lỏng (MHB); giếng chứa môi trường MHB và chủng vi khuẩn; giếng chứa môi trường MHB, vi khuẩn, DMSO; giếng chứa môi trường MHB, vi khuẩn, kháng sinh. Các giếng sẽ được ủ hiếu khí ở 37°C trong vòng 24 giờ trong tủ nuôi vi sinh. Sau thời gian ủ, quan sát bằng mắt thường so với đối chứng, xác định giếng không có sự tăng trưởng của vi khuẩn, sau đó giếng có nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ được nhận định là giếng có giá trị MIC của dung dịch pinostrobin. Trong mỗi giếng lấy 150  $\mu$ l dịch trải trên 3 đĩa Muller Hinton agar (MHA), mỗi đĩa 50  $\mu$ l dịch, sau đó tiếp tục được ủ trong tủ ấm ở 37°C trong 24 giờ. Sau thời gian ủ, vi khuẩn không hiện diện hoặc mật độ tế bào vi khuẩn trên đĩa nhỏ hơn 300 CFU/ml thì xác định nồng độ thấp nhất trong dãy pha loãng của cao phân đoạn trong giếng khảo sát là MIC [14]. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, trên cùng một sơ đồ thí nghiệm trên 3 đĩa 96 giếng.

### 2.3. Phương pháp xác định khả năng hợp lực của pinostrobin với vancomycin

FICI là chỉ số xác định khả năng hợp lực dựa trên phương pháp bàn cờ. Hoạt động ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn do sự kết hợp của pinostrobin với kháng sinh vancomycin được quan sát tại các giếng mà không có sự tăng trưởng của MRSA [15]. Thí nghiệm được bố trí lặp lại như thí nghiệm xác định giá trị MIC của cao phân đoạn. Các giếng được bố trí phối hợp pinostrobin và vancomycin theo sơ đồ thí nghiệm. Mỗi giếng gồm: 90  $\mu$ l môi trường lỏng Muller-Hinton, 10  $\mu$ l dịch vi khuẩn có nồng độ  $10^6$  CFU/ml, 50  $\mu$ l dung dịch pinostrobin (A), 50  $\mu$ l dung dịch vancomycin (B), thể tích cuối trong mỗi giếng là 200  $\mu$ l. Sau đó, đĩa 96 giếng được ủ trong tủ nuôi vi sinh ở 37°C, trong 24 giờ. Sau thời gian ủ, vi khuẩn không hiện diện hoặc mật độ tế bào vi khuẩn trên đĩa nhỏ hơn 300 CFU/ml được kiểm tra lại bằng phương pháp trải trên môi trường MHA. Trong mỗi giếng lấy 150  $\mu$ l dịch trải trên 3 đĩa Muller Hinton agar (MHA), mỗi đĩa 50  $\mu$ l dịch, sau đó tiếp tục được ủ trong tủ ấm ở 37°C trong 24 giờ (mỗi đĩa 50  $\mu$ l dịch), các đĩa này sẽ tiếp tục được ủ trong 24 giờ, ở 37°C trong tủ nuôi vi sinh. Sau thời gian ủ, đĩa trải không có sự hiện diện của vi khuẩn thì

giá trị nồng độ của cao phân đoạn/tinh chất và giá trị nồng độ của kháng sinh trong giếng khảo sát được sử dụng để tính toán chỉ số FIC theo công thức (1):

$$FICI = FIC_A + FIC_B = \frac{\text{MIC A trong sự kết hợp}}{\text{MIC A}} + \frac{\text{MIC B trong sự kết hợp}}{\text{MIC B}} \quad (1)$$

Nếu  $FICI \leq 0,5$  chỉ ra sự hợp lực; Nếu  $0,5 < FICI \leq 0,75$  chỉ ra khả năng cộng hợp (addition); Nếu  $0,75 < FICI \leq 1$  chỉ ra hợp lực một phần (partial synergy); Nếu  $2 < FICI$  chỉ ra khả năng không có tương tác (antagonism) [15-17]. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, trên cùng một sơ đồ thí nghiệm trên 3 đĩa 96 giếng.

**Bảng 1. Sơ đồ thí nghiệm giữa pinostrobin và vancomycin.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E	TSB	TSB+VK	DMSO 20%	DMSO 10%	VAN 16 (µg/ml)	VAN 8 (µg/ml)	Pino 1...pino 6 (51,2 µg/ml, DMSO 20%)					
F	TSB	TSB+VK	DMSO 20%	DMSO 10%	VAN 16 (µg/ml)	VAN 8 (µg/ml)	SCTT EA1...SCTT EA6 (2 mg/ml, DMSO 20%)					
G	pinostrobin (1,2,3) x VAN (8, 4, 2, 1)											
H	SCTT Ea (1,2,3) x VAN (8, 4, 2, 1)											

TSB: Môi trường lỏng Tryptone soy; VK: Vi khuẩn; VAN: Vancomycin; Pino 1: Pinostrobin (51,2 µg/ml); pino 6: Pinostrobin pha loãng theo dãy từ pino 1 (pha loãng 32 lần so với pino 1).

Theo bảng 1, cách ký hiệu trong sơ đồ thí nghiệm như sau: Pino1 là pinostrobin có nồng độ bằng 51,2 µg/ml. Sau mỗi giếng, nồng độ pha loãng theo dãy với độ pha loãng 2X đến pino 6 bằng 1,6 µg/ml được mô tả trong phương pháp. SCTT EA1 là cao phân đoạn ethyl acetate Trâm tròn có nồng độ bằng 2 mg/ml. Sau mỗi giếng, nồng độ pha loãng theo dãy với độ pha loãng 2X đến SCTT Ea 6 bằng 0,0625 mg/ml được mô tả trong phương pháp. Mỗi giếng trong sơ đồ thí nghiệm có thể tích cuối bằng 200 µl.

Giếng đối chứng chỉ có một biến gồm: 90 µl môi trường TSB, 10 µl dịch vi khuẩn có mật độ  $10^5$  CFU/ml, 100 µl dung dịch khảo sát (được ký hiệu trên sơ đồ). Kết hợp giữa pinostrobin và kháng sinh vancomycin được thực hiện ở dãy G trên đĩa 96 giếng. Kết hợp giữa cao phân đoạn ethyl acetate Trâm tròn với vancomycin được thực hiện ở dãy H trên đĩa 96 giếng. Các thử nghiệm được khảo sát trên chủng MRSA. Giếng kết hợp có hai biến là pinostrobin/cao phân đoạn ethyl acetate Trâm tròn với vancomycin gồm: 90 µl môi trường TSB, 10 µl dịch vi khuẩn có mật độ  $10^5$  CFU/ml, 50 µl pinostrobin/cao phân đoạn ethyl acetate Trâm tròn (được ký hiệu trên sơ đồ), 50 µl kháng sinh vancomycin có nồng độ được ký hiệu trên sơ đồ thí nghiệm.

#### 2.4. Phương pháp xác định khả năng ức chế sự hình thành màng sinh học trên MRSA bằng chụp ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM)

MIC là nồng độ thấp nhất ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn ở mức có thể quan sát được nên việc ức chế sự tăng trưởng có khả năng ảnh hưởng đến sự hình thành biofilm vì

vậy khả năng ức chế hình thành biofilm của pinostrobin trên MRSA được kiểm tra ở nồng độ dưới MIC cụ thể  $\frac{1}{2}$  MIC và  $\frac{1}{4}$  MIC, nhằm xác định khả năng ức chế biofilm trên MRSA của pinostrobin.

Mỗi đĩa petri có chứa tấm thủy tinh có đường kính 4x4 (cm) đã vô trùng được bổ sung các dung dịch gồm: pinostrobin, 10 µl dịch vi khuẩn nuôi qua đêm sao cho mật độ tế bào vi khuẩn trong đĩa bằng  $10^5$  CFU/ml, thêm môi trường TSB có 1% glucose để thể tích cuối cùng trong đĩa bằng 10 ml. Đối chứng đĩa petri có tấm thủy tinh vô trùng chỉ chứa môi trường TSB và 1% glucose với dịch vi khuẩn; đối chứng thứ hai là môi trường TSB có 1% glucose bổ sung kháng sinh cefoxitin ở nồng độ 128 µg/ml và dịch vi khuẩn. Tiếp tục ủ trong tủ ấm ở 35°C, trong vòng 24 giờ. Tiếp theo các đĩa và phiến kính được nhuộm với crystal violet theo phương pháp của E. Mataraci và cs (2012) [18] gồm các bước sau:

Sau khi ủ, môi trường nuôi được loại bỏ và các tấm thủy tinh được rửa ba lần bằng 250 µl PBS, để khô. Tiếp theo, 200 µl dung dịch methanol 99% được bổ sung vào đĩa có chứa tấm thủy tinh trong 20 phút để cố định tế bào vi khuẩn. Sau đó, dung môi methanol được loại bỏ, để khô trong 15 phút. Cuối cùng, các tấm thủy tinh được nhuộm với crystal violet 0,1% (v/v với nước) trong 5 phút. Sử dụng nước cất để rửa vết bẩn dư thừa, sau đó để khô. Bổ sung 250 µl ethanol 95° trong 10 phút. Kết quả được đọc dựa vào sự bắt màu tím trên tấm thủy tinh khi có sự hình thành màng sinh học, nếu tấm thủy tinh không bắt màu tím chứng tỏ không có sự hình thành màng sinh học.

Sau cùng các phiến kính được dán trên băng định carbon và được đưa vào thiết bị phun xạ phủ platinum (Pt). Các mẫu sau đó được đưa vào buồng chụp và tiến hành chụp ảnh SEM bằng máy FESEM S4800 (Hitachi, Nhật).

#### 2.5. Phương pháp xác định khả năng ức chế biểu hiện protein PBP2a của pinostrobin trên chủng MRSA bằng Oxiid PBP2' Latex Agglutination kit

Oxiid PBP2' Latex Agglutination kit là một kit thử nghiệm dựa trên ngưng kết miễn dịch nhanh nhằm phát hiện protein PBP2' (còn được gọi là protein PBP2a) là protein nhận diện chủng vi MRSA. Kit Oxiid PBP2' Latex thuận lợi là xác định trực tiếp sự xuất hiện protein PBP2a. Các thành phần của kit do hãng cung cấp gồm có kháng thể đơn dòng kháng trực tiếp PBP2', dung dịch chiết 1, dung dịch chiết 2, các thẻ, que trải.

Chuẩn bị MRSA xử lý với pinostrobin: ống eppendorf có chứa môi trường TSB và một khuẩn lạc MRSA được nuôi qua đêm ở 37°C, mật độ tế bào đạt  $10^9$  CFU/ml. Sau đó, chuẩn bị ống eppendorf khác bổ sung 10 µl dịch vi khuẩn nuôi qua đêm, 250 µl cao phân đoạn ở nồng độ trong ống bằng giá trị MIC, 240 µl môi trường TSB, thể tích cuối trong mỗi ống bằng 500 µl. Tiếp theo, ủ ống eppendorf trong

vòng 6 giờ, ở 37°C, trong tủ nuôi vi sinh. Cách chuẩn bị ống eppendorf này nhằm xử lý tế bào MRSA trước tác động của pinostrobin. Ống đối chứng gồm: 10 µl dịch vi khuẩn nuôi qua đêm, 250 µl cefoxitin ở nồng độ 128 µg/ml, 240 µl môi trường TSB. Sau thời gian nuôi các ống eppendorf được ly tâm tốc độ 6000 vòng/phút, trong thời gian 5 phút, loại bỏ môi trường nuôi, thu cặn. Các cặn trong ống được hòa lại với 100 µl dung dịch đệm PBS. Các ống này sẽ là nguyên liệu để chiết PBP2a trên chủng MRSA, sau khi MRSA bị xử lý với pinostrobin.

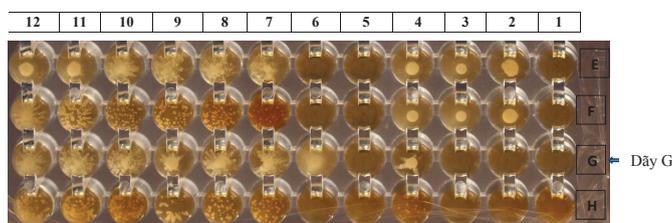
Phương pháp chiết PBP2a và phản ứng kết tủa do sự kết hợp kháng thể - kháng nguyên PBP2a (theo hướng dẫn từ nhà sản xuất): Cho 4 giọt dung dịch chiết 1 (thành phần trong kit) vào tube mới, bổ sung 5 µl dịch vi khuẩn MRSA đã chuẩn bị ở trên. Sau đó, đặt tube vào nước nóng trên 95°C, trong vòng 3 phút. Sau 3 phút, di chuyển các tube ra khỏi bể gia nhiệt và làm nguội đến nhiệt độ phòng. Tiếp theo, thêm 1 giọt dung dịch chiết 2 vào tube và trộn đều. Sau khi trộn đều, ly tâm hỗn hợp trên tốc độ 4500 vòng/phút trong vòng 5 phút. Sau đó loại cặn, thu dịch. Dung dịch thu được sẽ được tiếp tục khảo sát trên thẻ. 50 µl dịch thu được cho vào mỗi vòng trên thẻ khảo sát, một giọt dung dịch Latex có chứa kháng thể đơn dòng kháng PBP2a được thêm vào một vòng trên thẻ. Dùng que trải để trộn đều hỗn hợp trên, sau đó tiếp tục lắc đều các thẻ trong 3 phút cho đến khi nhìn thấy ngưng kết dưới điều kiện ánh sáng bình thường. Kết quả được thu nhận dựa trên sự tủa trên thẻ, sự tủa được giải thích là do sự ngưng kết miễn dịch giữa kháng thể đơn dòng bất PBP2a và PBP2a thu được từ vách tế bào MRSA, cường độ tủa được so sánh với đối chứng; đối chứng âm là không thấy tủa trên vòng không bổ sung kháng thể đơn dòng bất PBP2a; đối chứng dương là sự tủa do ngưng kết miễn dịch giữa kháng thể đơn dòng bất PBP2a và PBP2a thu được từ vách tế bào MRSA [19].

Xử lý thống kê kết quả thu được bằng phần mềm STATGRAPHICS Centurion XV (Statpoint Technologies, Hoa Kỳ). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn.

### 3. Kết quả và bàn luận

Khảo sát khả năng kháng MRSA và khả năng hợp lực giữa pinostrobin và vancomycin được tiến hành bằng phương pháp vi pha loãng và phương pháp bàn cờ. Thí nghiệm được tiến hành theo sơ đồ bảng 1. Kết quả chỉ ra khả năng hợp lực với vancomycin được trình bày ở hình 1, bảng 2.

Theo sơ đồ bố trí thí nghiệm bảng 1, từ giếng số 7 ở dãy E đến giếng số 12 ở dãy E hiện diện sự tăng trưởng của MRSA, nên giá trị MIC của pinostrobin được xác định lớn hơn 51,2 µg/ml. Ở dãy G là sự hợp lực giữa pinostrobin và vancomycin, từ giếng số 1 đến giếng số 3 và 5 không có sự tăng trưởng của MRSA. Dựa vào hình 1, chỉ số FIC được tính toán dựa trên giếng số 3 của dãy G.



Hình 1. Thí nghiệm khả năng hợp lực của pinostrobin với vancomycin.

Bảng 2. Chỉ số FIC của pinostrobin và vancomycin.

Nồng độ ức chế tối thiểu (µg/ml)	1	2	3	4
MIC pinostrobin-vanco	12,80	12,80	12,80	12,80
MIC pinostrobin	51,20	51,20	51,20	51,20
MIC vanco-pinostrobin	2,00	1,00	0,50	0,25
MIC vanco	2,00	2,00	2,00	2,00
FIC pinostrobin	0,25	0,25	0,25	0,25
FIC vancomycin	1,00	0,50	0,25	0,12
FICI	1,25	0,75	<b>0,50</b>	0,37
	<b>Hợp lực</b>			

MIC pinostrobin-vanco: Giá trị MIC của pinostrobin trong sự hợp lực với vancomycin; MIC vanco-pinostrobin: Giá trị MIC của vancomycin trong sự hợp lực với pinostrobin; MIC pinostrobin: Giá trị MIC của pinostrobin; MIC vanco: giá trị MIC của vancomycin; FIC pinostrobin: chỉ số hợp lực của pinostrobin, FIC vancomycin: Chỉ số hợp lực của vancomycin.

Ở dãy G là sự hợp lực giữa pinostrobin và vancomycin, các giếng làm đục môi trường chứng tỏ có sự hiện diện của MRSA.

Các chất có hoạt tính kháng khuẩn yếu thường tham gia làm chất trợ trong các liệu pháp kháng khuẩn, pinostrobin đã được báo cáo có hoạt tính kháng khuẩn yếu. Đồng thời, kết quả trong thí nghiệm xác định pinostrobin có khả năng hợp lực với vancomycin thông qua chỉ số FIC bằng 0,5. Công thức hợp lực giữa pinostrobin và vancomycin cho hoạt tính kháng MRSA được xác định theo nồng độ tương ứng là 12,8 µg/ml : 0,5 µg/ml (1:1). Trong đó, nồng độ của pinostrobin trong sự hợp lực giảm 4 lần so với giá trị MIC của pinostrobin một mình, nồng độ của vancomycin trong sự hợp lực giảm 4 lần so với giá trị MIC của vancomycin một mình. Hơn nữa, tinh chất pinostrobin là chất chính trong cao Trâm tròn đã được báo cáo, cao phân đoạn Trâm tròn cho hoạt tính hợp lực với vancomycin, điều đó chứng minh hoạt tính hợp lực với kháng sinh vancomycin của cao phân đoạn Trâm tròn có liên quan đến tinh chất pinostrobin.

Pinostrobin theo các nghiên cứu trước xác định hoạt tính kháng MRSA trung bình yếu. Nghiên cứu của L.R. Christena và cs (2015), chứng minh pinostrobin có tính hợp lực với ciprofloxacin, với công thức hợp lực theo nồng độ tương ứng là 15 µg/ml : 0,125 µg/ml (1:1), giá trị MIC của ciprofloxacin trong sự hợp lực với pinostrobin bằng 0,125 µg/ml, giảm 128 lần so với giá trị MIC của kháng sinh [20].

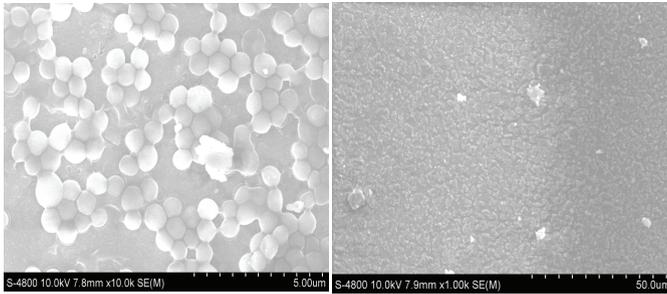
Pinostrobin được xác định có vai trò ức chế kênh bơm thuốc trên chủng MRSA. Tuy nhiên, sự hợp lực của pinostrobin với vancomycin vẫn chưa được đề cập. Trong thử nghiệm này, pinostrobin được xác định là có sự hợp lực với vancomycin. Tác dụng hợp lực là hai chất ức chế hai chặng khác nhau của cùng một con đường tổng hợp [13], vancomycin có đích tác động là tiền chất tổng hợp vách tế bào MRSA, vì vậy pinostrobin có thể ức chế một đích tác động có cùng con đường tổng hợp vách tế bào MRSA. Kết quả này đã xác định một vai trò mới của pinostrobin trong hoạt tính ức chế vi khuẩn MRSA. Dựa trên những kết quả đã có, đề tài tiếp tục khảo sát hoạt tính ức chế sự hình thành biofilm, ức chế biểu hiện protein PBP2a của pinostrobin trên MRSA nhằm tìm kiếm đích tác động của pinostrobin trên MRSA.

#### Ức chế hình thành màng sinh học

MRSA được nuôi trong môi trường TSB và 1% glucose bổ sung pinostrobin ở các nồng độ lần lượt 25,6 µg/ml, 12,8 µg/ml. Ở hình 2 là MRSA trong màng sinh học ở đối chứng môi trường không bổ sung pinostrobin. Các tế bào MRSA trong màng sinh học có hình thái tế bào tròn, vách tế bào rõ đặc trưng, các tế bào xếp như chùm nho.

Độ phóng đại x10.0K

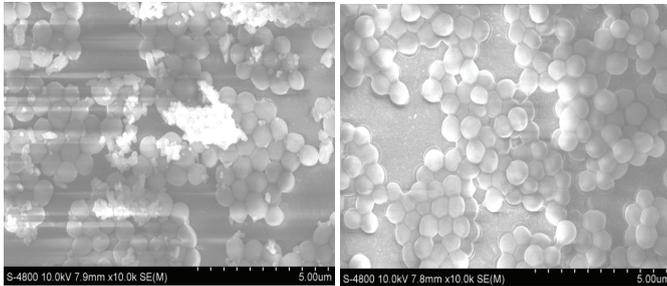
Độ phóng đại x1.0K



Hình 2. Màng sinh học của chủng MRSA. MRSA được nuôi trong môi trường TSB+1% glucose.

Độ phóng đại x10.0K 25,6 mg/l

Độ phóng đại x10.0K 12,8 mg/l

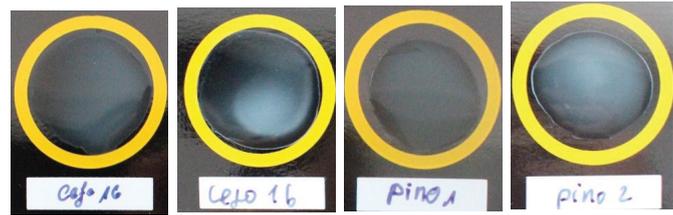


Hình 3. Môi trường TSB+1% glucose được bổ sung tinh chất pinostrobin.

Ở hình 3, MRSA hình thành màng sinh học trong môi trường nuôi có bổ sung pinostrobin, Tế bào MRSA mật độ tế bào tương đồng với đối chứng, hình dạng tế bào tròn, vách tế bào rõ đặc trưng tương đồng với đối chứng. Kết quả xác định pinostrobin không có khả năng ức chế hình thành màng sinh học trên MRSA ở các nồng độ khảo sát.

#### Ức chế biểu hiện protein PBP2a trên chủng MRSA

Các chủng MRSA lâm sàng thường có cơ chế kháng kháng sinh phổ biến là biểu hiện gen *mecA* thông qua protein PBP2a. Thử nghiệm xác định sự hiện của protein PBP2a trên chủng MRSA khi chủng MRSA được nuôi trong môi trường có bổ sung pinostrobin được thực hiện bằng kit Latex Agglutination.



Vòng 1: MRSA được nuôi trong môi trường có bổ sung cefoxitin (0,016 mg/ml) đối chứng, không có kháng thể bắt PBP2a, vòng 2: MRSA được nuôi trong môi trường có bổ sung cefoxitin (0,016 mg/ml) đối chứng, có kháng thể bắt PBP2a, vòng 3: MRSA được nuôi trong môi trường có bổ sung pinostrobin với nồng độ bằng ½ MIC (25,6 µg/ml) (pino1), vòng 4: MRSA được nuôi trong môi trường S có bổ sung pinostrobin với nồng độ pinostrobin bằng ¼ MIC (12,8 µg/ml) (pino2).

Hình 4. Thử nghiệm xác định sự hiện diện PBP2a trên chủng MRSA.

Dựa vào hình 4, khi vi khuẩn được nuôi trong môi trường TSB có bổ sung kháng sinh cefoxitin ở nồng độ bằng 0,016mg/ml đây là nồng độ cảm ứng biểu hiện PBP2a, ở vòng 2 kết quả chỉ ra có sự tủa của kháng thể bắt kháng nguyên PBP2a. So với vòng 1 là đối chứng âm không có kháng thể bắt PBP2a. Tương tự, ở vòng 3 không thấy rõ cường độ tủa của kháng thể bắt PBP2a tương đương đối chứng âm (vòng 1), chứng tỏ pinostrobin ở nồng độ 25,6 µg/ml có khả năng ức chế sự biểu hiện PBP2a. Ngược lại, ở vòng 4 cường độ tủa của kháng thể bắt kháng nguyên PBP2a tương đương đối chứng dương (vòng 2), chứng tỏ pinostrobin ở nồng độ bằng 12,8 µg/ml không có khả năng ức chế sự biểu hiện của protein PBP2a trên MRSA.

Protein PBP2a là enzyme tham gia vào quá trình tổng hợp vách tế bào trên chủng MRSA. Kết quả xác định được pinostrobin ở nồng độ 25,6 µg/ml ức chế sự biểu hiện của protein PBP2a trên MRSA.

#### 4. Kết luận

Các chất có hoạt tính kháng khuẩn yếu thường tham gia làm chất trợ trong các liệu pháp kháng khuẩn. Pinostrobin là một chất kháng khuẩn yếu, nhưng có khả năng hợp lực mạnh với vancomycin đã được xác định trong hoạt tính kháng MRSA với công thức hợp lực giữa pinostrobin và vancomycin được xác định theo tỷ lệ tương ứng bằng 25,6. Kết quả trong nghiên cứu chỉ ra khả năng đích tác động của pinostrobin trên MRSA có thể là tiền chất tổng hợp vách tế bào.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P. Bremer, G. Fletcher, C. Osborne (2004), “Staphylococcus aureus”, *New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited Private Bag*, **4704**, pp.1-6.
- [2] E. Palavecino (2007), “Clinical, epidemiological, and laboratory aspects of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections”, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Protocols*, **391**, pp.1-19, DOI: 10.1007/978-1-59745-468-1\_1.
- [3] D.R. Chung, J.H. Song, S.H. Kim, et al. (2011), “High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **184(12)**, pp.1409-1417, DOI: 10.1164/rccm.201102-0349OC.
- [4] World Health Organization (2017), “Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics”, <https://remed.org/wp-content/uploads/2017/03/global-priority-list-of-antibiotic-resistant-bacteria-2017.pdf>, accessed 3 August 2023.
- [5] T. Morrisette, S. Alosaimy, J.C. Abdul-Mutakabbir, et al. (2020), “The evolving reduction of vancomycin and daptomycin susceptibility in MRSA-salvaging the gold standards with combination therapy”, *Antibiotics*, **9(11)**, DOI: 10.3390/antibiotics9110762.
- [6] A.M. Spagnolo, P. Orlando, D. Panatto, et al. (2014), “*Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in healthcare settings”, *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, **55(4)**, pp.137-144.
- [7] G.D. Wright, A.D. Sutherland (2007), “New strategies for combating multidrug-resistant bacteria”, *Trends in Molecular Medicine*, **13(6)**, pp.260-267, DOI: 10.1016/j.molmed.2007.04.004.
- [8] M. Ayaz, F. Ullah, A. Sadiq, et al. (2019), “Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance”, *Chemico-Biological Interactions*, **308**, pp.294-303, DOI: 10.1016/j.cbi.2019.05.050.
- [9] B.C.L. Chan, C. Lau, C. Jolival, et al. (2011), “Chinese medicinal herbs against antibiotic-resistant bacterial pathogens”, *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, **2**, pp.773-781.
- [10] M.T.N.L. Thanh, T.V. Thanh, H.A. Hoang (2022), “Synergism of *Syzygium glomerulatum* G., *Carallia brachiata* L., *Grewia asiatica* L. extracts against MRSA ATCC 33591”, *Can Tho Journal of Medicine and Pharmacy*, **55**, pp.66-73, DOI: 10.58490/ctump.2022i55.382 (in Vietnamese).
- [11] M.T.N.L. Thanh, P.M. Thien, N.T. Vy, et al. (2019), “Antibacterial activity of ethylacetate fraction from ethanol Tram tron *Syzygium glomerulatum* extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)”, *Vietnam Journal of Preventive Medicine-VJPM*, **29(2)**, pp.120-128 (in Vietnamese).
- [12] T.N.L.M. Thanh, H.A. Hoang, T.V. Truong (2020), “Antibacterial activity of Tram tron *Syzygium glomerulatum* extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”, *Chemical Engineering*, **78**, pp.235-240, DOI: 10.3303/CET2078040.
- [13] Ministry of Health (2015), *Instructions for Antibiotic Use*, Medical Publishing House, 277pp (in Vietnamese).
- [14] P. Wayne (2010), “Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement”, *CLSI Document M100-S20*, pp.100-121.
- [15] R.L. White, D.S. Burgess, M. Manduru, et al. (1996), “Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: Time-kill, checkerboard, and E test”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40(8)**, pp.1914-1918, DOI: 10.1128/aac.40.8.1914.
- [16] A.A. Issam, S. Zimmermann, J. Reichling, et al. (2015), “Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens”, *Phytomedicine*, **22(2)**, pp.245-255, DOI: 10.1016/j.phymed.2014.11.019.
- [17] C.F. Kuok, S.O. Hoi, C.F. Hoi, et al. (2017), “Synergistic antibacterial effects of herbal extracts and antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A computational and experimental study”, *Experimental Biology and Medicine*, **242(7)**, pp.731-743, DOI: 10.1177/1535370216689828.
- [18] E. Mataraci, S. Dosler (2012), “*In vitro* activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56(12)**, pp.6366-6371, DOI: 10.1128/AAC.01180-12.
- [19] E.M. Marlowe, A.J. Linscott, M. Kanatani, et al. (2002), “Practical therapeutic application of the oxid PBP2’ latex agglutination test for the rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in blood cultures”, *American Journal of Clinical Pathology*, **118(2)**, pp.287-291, DOI: 10.1309/L6WV-6KLB-BWMH-APEV.
- [20] L.R. Christena, S. Subramaniam, M. Vidhyalakshmi, et al. (2015), “Dual role of pinostrobin-a flavonoid nutraceutical as an efflux pump inhibitor and antibiofilm agent to mitigate food borne pathogens”, *RSC Advances*, **5(76)**, pp.61881-61887, DOI: 10.1039/C5RA07165H.