

ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HỒ CHÍ MINH  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

NGUYỄN SĨ TUẤN

**NGHIÊN CỨU TÍNH KHÁNG CARBAPENEM Ở MỨC ĐỘ PHÂN TỬ  
CỦA *ACINETOBACTER BAUMANNII* GÂY NHIỄM KHUẨN  
TẠI BỆNH VIỆN ĐA KHOA THỐNG NHẤT ĐỒNG NAI**

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học  
Mã số chuyên ngành: 60420201

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT

TP. HỒ CHÍ MINH NĂM 2019

Công trình được hoàn thành tại **Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM**

Người hướng dẫn khoa học 1: PGS. TS. Nguyễn Thúy Hương

Người hướng dẫn khoa học 2: TS. BS. Phạm Hùng Vân

Phản biện độc lập 1:

Phản biện độc lập 2:

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án họp tại

.....  
.....

vào lúc            giờ            ngày            tháng            năm

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Khoa học Tổng hợp Tp. HCM
- Thư viện Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM

## DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Nguyễn Sĩ Tuấn**, Nguyễn Ngọc Thanh, Lưu Trần Linh Đa và Nguyễn Thúy Hương. (2014). Giá trị MIC của *Acinetobacter baumannii* trong thực hành lâm sàng ở Bệnh viện Đa khoa Thống Nhất Đồng Nai. Tạp chí Y học Thực hành, 1 (902), 64-66.
2. **Nguyễn Sĩ Tuấn**, Lưu Trần Linh Đa, Lê Duy Nhất, Hứa Mỹ Ngọc, Nguyễn Ngọc Thanh, Phạm Thị Thanh Thủy, Phạm Văn Dũng và Nguyễn Thúy Hương. (2014). Phát hiện các carbapenemase kiểu OXA ở *Acinetobacter baumannii* bằng multiplex PCR-ELISA. Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh, 18 (6): 458-462.
3. **Nguyễn Sĩ Tuấn**, Nguyễn Ngọc Thanh và Nguyễn Thúy Hương. (2014). Các tiến bộ gần đây trong sàng lọc đề kháng kháng sinh ở *Acinetobacter baumannii*. Tạp chí Truyền nhiễm Việt Nam, 3: 1-7.
4. **Nguyễn Sĩ Tuấn**, Phan Thị Vân Anh, Trần Viết Lãm, Phạm Văn Dũng và Nguyễn Thúy Hương. (2016). Tác dụng phối hợp của colistin với meropenem lên *Acinetobacter baumannii* mang nhóm gene thủy phân carbapenem gây viêm phổi bệnh viện. Tạp chí Y học Thực hành. 4 (1001): 5 – 9.
5. **Nguyễn Sĩ Tuấn**, Phạm Thị Thu Hằng, Lê Duy Nhất và Nguyễn Thúy Hương. (2017). Giải trình tự hệ gene chủng *Acinetobacter baumannii* đa kháng lâm sàng tại Việt Nam. Tạp chí Y học Thực hành, 3 (1037): 159 – 164.
6. **Si-Tuan, N.**, Thanh, N. N., Hang, P. T. T., Van Dung, P., & Huong, N. T. (2016). Antimicrobial resistance patterns among *Acinetobacter baumannii* isolated from Thong Nhat Dong Nai General Hospital. *Orthopedics*, 2(3), 61-75.
7. Anh, N. T., Nga, T. V. T., Tuan, H. M., **Tuan, N. S.**, Chau, N. V. V., Baker, S., & Duong, H. H. T. (2017). Molecular epidemiology and antimicrobial resistance phenotypes of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients in three hospitals in southern Vietnam. *Journal of medical microbiology*, 66(1), 46-53.
8. **Si-Tuan, N.**, Ngoc, H. M., Hang, P. T. T., Nguyen, C., Van, P. H., & Huong, N. T. (2017). New eight genes identified at the clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* DMS06669 strain in a Vietnam hospital. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 16(1), 74.



# CHƯƠNG 1 GIỚI THIỆU

## 1.1. Chi *Acinetobacter*

### 1.1.1. *Acinetobacter baumannii*

**Bảng 1. 1.** Các điểm đặc trưng của giống *Acinetobacter*

Test	<i>A. baumannii</i>	<i>A. lwoffii</i>
Oxidase	-	-
Di động	-	-
Phát triển trên thạch MacConkey	+	+
Phát triển ở 42 <sup>0</sup> C	+	-
OF glucose	+	-
Khử NO <sub>3</sub>	-	-
Gelatin	V	V
Urea	V	V
Sinh sắc tố	-	-

+ : ≥ 90% các chủng dương tính; - : ≥ 90% các chủng âm tính;  
V : 11% - 89% các chủng dương tính [1].

### 1.1.2. Sinh bệnh học và sự đề kháng kháng sinh

## 1.2. Các yếu tố độc lực của *Acinetobacter baumannii*

### 1.3. Nhóm kháng sinh carbapenem

#### 1.3.1. Hóa học

#### 1.3.2. Cơ chế tác động

#### 1.3.3. Sự đề kháng

### 1.4. Carbapenemase

#### 1.4.1. Carbapenemase Ambler lớp A

#### 1.4.2. Carbapenemase Ambler lớp B – Metallo-beta-lactamase

#### 1.4.3. Beta-lactamase lớp D thủy phân carbapenem – Oxacillinase

#### 1.4.4. Các trình tự chèn (IS) ở *Acinetobacter*

### 1.5. Sự đề kháng kháng sinh ở *Acinetobacter baumannii*

#### 1.5.1. Tình hình đề kháng carbapenem trên thế giới

#### 1.5.2. Nghiên cứu về *Acinetobacter baumannii* kháng thuốc tại Việt Nam

### 1.6. Cơ chế tác động của kháng sinh trong các phối hợp

### 1.7. Giải trình tự hệ gene thế hệ tiếp theo (NGS)

# CHƯƠNG 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

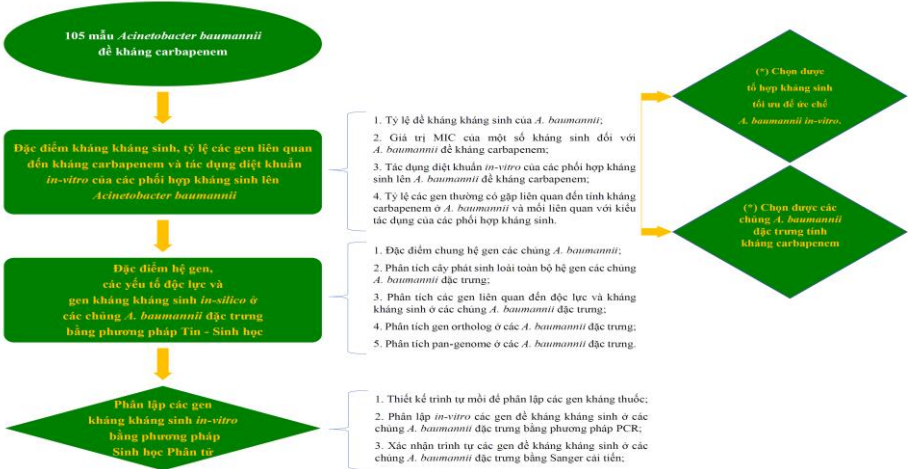
## 2.1. Địa điểm và thời gian thực hiện

## 2.2. Vật liệu

### 2.2.1. Hóa chất

### 2.2.2. Chủng vi khuẩn

## 2.3. Sơ đồ nghiên cứu của luận án



## 2.4. Các phương pháp nghiên cứu

### 2.4.1. Các phương pháp vi sinh lâm sàng

#### 2.4.1.1. Phương pháp cấy đằm

#### 2.4.1.2. Phương pháp định danh và kháng sinh đồ tự động

#### 2.4.1.3. Phương pháp hiệp đồng bàn cờ

### 2.4.2. Các phương pháp sinh học phân tử

#### 2.4.2.1. Phương pháp tách chiết DNA

#### 2.4.2.2. Phương pháp PCR đa môi

#### 2.4.2.3. Phương pháp realtime – PCR

#### 2.4.2.4. Phương pháp cải tiến của phương pháp Sanger

#### 2.4.2.5. Phương pháp Illumina sequencing

#### 2.4.2.6. Phương pháp điện di trên gel agarose

### 2.4.3. Các phương pháp Tin – Sinh học

#### 2.4.4. Phương pháp thống kê

## CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1 Kết quả và bàn luận

#### 3.1.1. Đặc điểm kháng kháng sinh, tỷ lệ các gen liên quan đến kháng carbapenem và tác dụng diệt khuẩn *in-vitro* của các phối hợp kháng sinh lên *Acinetobacter baumannii*

##### 3.1.1.1. Đặc điểm chung của nhóm bệnh nhân tham gia nghiên cứu

##### 3.1.1.2. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của *Acinetobacter baumannii*

*A. baumannii* trong nghiên cứu này không nhạy cảm hoàn toàn (100%) với hầu hết các kháng sinh thử nghiệm (bao gồm 2 nhóm kháng sinh lớn là beta-lactam và fluoro-quinolon). Nhóm aminoglycoside thường được phối hợp với beta-lactam trong điều trị nhiễm khuẩn nặng do Gram âm, nay cũng đã không còn nhạy cảm (100% gentamicin không còn nhạy cảm với *A. baumannii*) hoặc còn nhạy cảm với tỷ lệ rất thấp (7,5% với tobramycin hoặc 10,4% với amikacin). Mặc dù còn nhạy cảm với *A. baumannii* với tỷ lệ 26,4%, Bactrim chỉ thích hợp cho điều trị các nhiễm khuẩn nhẹ do trực khuẩn Gram âm. Do đó, hai kháng sinh còn nhạy cảm với tỷ lệ rất cao, tigecycline (tỷ lệ nhạy cảm là 99,1%) và colistin (tỷ lệ nhạy cảm là 100%) là hai kháng sinh được xem xét lựa chọn cho điều trị nhiễm khuẩn *A. baumannii* đa đề kháng. Trước thực trạng chỉ có 2 kháng sinh còn nhạy cảm tỷ lệ cao với *A. baumannii* đa đề kháng, việc sử dụng thêm rifampicin trong các phối hợp kháng sinh với meropenem được xem xét thử nghiệm để đánh giá các tác dụng hiệp đồng và cộng lực *in-vitro* lên nhóm vi khuẩn đa kháng thuốc này.

#### 3.1.2. MIC của colistin, meropenem, rifampicin và tigecycline đối với *Acinetobacter baumannii* đề kháng carbapenem

##### 3.1.2.1. MIC của colistin với *Acinetobacter baumannii* đề kháng carbapenem

**Bảng 3. 1.** Giá trị MIC của colistin đối với *A. baumannii* đề kháng carbapenem

MIC_colistin, µg/ml		1,0	2,0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,5		
Tần số	5	87	13
Tỷ lệ %	4,7	82,1	12,3

3.1.2.2. MIC của meropenem đối với *A. baumannii* đề kháng carbapenem

**Bảng 3. 2.** Giá trị MIC meropenem đối với *A. baumannii* đề kháng carbapenem

MIC_Meropenem, µg/ml			
Meropenem	32	64	128
Tần số	23	64	18
Tỷ lệ %	21,7	60,4	17

3.1.2.3. MIC của rifampicin với *A. baumannii* đề kháng carbapenem

**Bảng 3. 3.** Giá trị MIC của Rifampicin với *A. baumannii* đề kháng carbapenem

MIC_Rifampicin, µg/ml	1,0	2,0	4,00	8,00	16
Rifampicin					
Tần số	2	13	48	33	8
Tỷ lệ %	1,9	12,3	45,3	31,1	7,5

3.1.2.4. MIC của tigecycline đối với *A. baumannii* đề kháng carbapenem

**Bảng 3. 4.** Giá trị MIC của Tigecycline với *A. baumannii* đề kháng carbapenem

MIC_Tigecycline, µg/ml	0,125	0,25	0,5	1	2	8
Tigecycline						
Tần số	2	13	48	33	8	1
Tỷ lệ %	1,9	12,3	45,3	31,1	7,5	0,9

Các kháng sinh còn nhạy cảm cao với các chủng *A. baumannii* đề kháng với carbapenem là colistin (còn nhạy cảm 100%), tigecycline (còn nhạy cảm 99,1%) và rifampicin (còn nhạy cảm 59,5%). Tuy nhiên, về mặt dược động – lực học, để điều trị hiệu quả các nhiễm khuẩn do *A. baumannii* đa đề kháng (bao gồm đề kháng với meropenem), các kháng sinh này nên được tổ hợp với meropenem (meropenem/colistin, meropenem/rifampicin) hoặc tổ hợp với nhau (colistin/tigecycline) để tận dụng các cơ chế tác động khác nhau của mỗi kháng sinh trong từng tổ hợp kháng sinh nhằm tìm kiếm các tác dụng hiệp đồng và cộng lực.



### 3.1.3. Tác dụng diệt khuẩn in-vitro của các phối hợp kháng sinh lên *Acinetobacter baumannii*

#### 3.1.3.1. Các kiểu tác dụng in-vitro khi thử nghiệm phối hợp kháng sinh lên *Acinetobacter baumannii* đề kháng carbapenem

**Bảng 3. 5.** Các kiểu tác dụng in-vitro của 3 tổ hợp kháng sinh lên *A. baumannii* đề kháng carbapenem

Kiểu tác dụng Tổ hợp kháng sinh	Hiệp đồng		Cộng lực		Độc lập		Đối kháng	
	Tần số	Tỷ lệ %	Tần số	Tỷ lệ %	Tần số	Tỷ lệ %	Tần số	Tỷ lệ %
<b>Meropenem/Colistin</b>	<b>45</b>	<b>42,9</b>	<b>54</b>	<b>51,4</b>	<b>6</b>	<b>5,7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Meropenem/Rifampicin	36	34,3	50	47,6	18	17,1	1	1
Tigecycline/Colistin	5	4,8	33	31,4	67	63,8	0	0

Các kiểu phối hợp kháng sinh giữa meropenem/colistin và meropenem/rifampicin có tác dụng hiệp đồng và cộng lực với tỷ lệ rất cao, lần lượt là 94,3% và 81,9% lên các chủng *A. baumannii*. Tuy nhiên, tổ hợp tigecycline/colistin chỉ cho tác dụng hiệp đồng và cộng lực với tỷ lệ là 36,2%. Do đó, cần cân nhắc việc phối hợp tigecycline với colistin trong điều trị các nhiễm khuẩn *A. baumannii* đa đề kháng.

#### 3.1.3.2. Tác dụng của colistin, rifampicin ở nồng độ thấp hơn MIC chuyển *Acinetobacter baumannii* từ không nhạy meropenem thành nhạy

##### a. Tác dụng của colistin ở nồng độ thấp hơn MIC chuyển *A. baumannii* từ không nhạy meropenem thành nhạy

**Bảng 3. 6.** Phân bố các chủng *A. baumannii* chuyển từ không nhạy meropenem thành nhạy khi có sự phối hợp với colistin ở các mức nồng độ thấp hơn MIC

Nồng độ colistin ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC meropenem $\leq 8 \mu\text{g/ml}$	
	Tần số	Tỷ lệ, %
0,125	0	0
0,5	3	2,9
1	34	32,4
2	101	96,2

Từ Bảng 3.8 cho thấy, colistin ở các nồng độ dưới MIC có khả năng chuyển các chủng *Acinetobacter baumannii* không nhạy meropenem thành nhạy. Cụ thể, ở

mức nồng độ 1,0 µg/ml colistin, tỷ lệ chuyển chủng bắt đầu rõ rệt (chiếm tỷ lệ 32,4%) và hầu như có khả năng chuyển các chủng *A. baumannii* không nhạy meropenem thành nhạy ở nồng độ colistin 2,0 µg/ml colistin (chiếm 96,2%).

*b. Tác dụng của rifampicin ở nồng độ thấp hơn MIC chuyển Acinetobacter baumannii từ không nhạy meropenem thành nhạy*

**Bảng 3. 7.** Phân bố các chủng *A. baumannii* chuyển từ không nhạy meropenem thành nhạy khi có sự phối hợp với rifampicin ở các mức nồng độ thấp hơn MIC

Nồng độ rifampicin (µg/ml)	MIC_meropenem ≤ 8 µg/ml	
	Tần số	Tỷ lệ, %
0,25	0	0
0,5	2	1.9
1,0	4	3.8
2,0	64	61
4,0	98	93.3

Từ Bảng 3.9 cho thấy, rifampicin ở các nồng độ dưới MIC có khả năng chuyển các chủng *A. baumannii* không nhạy meropenem thành nhạy. Cụ thể, ở mức nồng độ 2,0 µg/ml colistin, tỷ lệ chuyển chủng bắt đầu rõ rệt (chiếm tỷ lệ 61%) và hầu như có khả năng chuyển các chủng *A. baumannii* không nhạy meropenem thành nhạy ở nồng độ rifampicin 4,0 µg/ml colistin (chiếm 93,3%).

*3.1.3.3. So sánh tác dụng hiệp đồng và cộng lực của 3 tổ hợp kháng sinh đối với Acinetobacter baumannii*

**Bảng 3. 8.** Tóm tắt kiểm định giả thuyết về tác dụng hiệp đồng và cộng lực của 3 tổ hợp kháng sinh đối với *A. baumannii*

STT	Giả thuyết	Phép kiểm	<i>p</i>	Giả thuyết
01	Phân phối các giá trị khác nhau trên tổ hợp meropenem/colistin; meropenem/rifampicin là tương đương nhau	Mc. Nemar	0,011	Bác bỏ
02	Phân phối các giá trị khác nhau trên tổ hợp meropenem/colistin; tigecycline/colistin là tương đương nhau	Mc. Nemar	0,001	Bác bỏ
03	Phân phối các giá trị khác nhau trên tổ hợp meropenem/rifampicin; tigecycline/colistin là tương đương nhau	Mc. Nemar	0,001	Bác bỏ

Tóm lại, tác dụng hiệp đồng và cộng lực của tổ hợp meropenem/colistin là cao nhất, tiếp đến là tổ hợp meropenem/rifampicin và tác dụng hiệp đồng và cộng lực của tổ hợp tigecycline/colistin là thấp nhất. Do đó, trong thực hành lâm sàng, cần nhắc phối hợp giữa meropenem/colistin hoặc meropenem/rifampicin trước khi nghĩ tới giải pháp phối hợp tigecycline/colistin trong điều trị nhiễm khuẩn *A. baumannii* đa đề kháng có đề kháng với carbapenem.

3.1.4. Tỷ lệ gen  $bla_{NDM-1}$ , *ISAbal* và các gen mã hóa oxacillinase thường gặp có liên quan đến tính kháng carbapenem ở *A. baumannii* đa đề kháng

**Bảng 3. 9.** Phân bố gen liên quan đến tính kháng carbapenem ở *A. baumannii*

Các gen liên quan đến tính kháng carbapenem ở <i>A. baumannii</i>	Tần số	Tỷ lệ %
$bla_{KPC}$	0	0
$bla_{OXA-58}$	8	7,6
$bla_{NDM-1}$	14	13,3
$bla_{OXA-23}$	83	79
<i>ISAbal</i>	98	93,3
$bla_{OXA-51}$	102	97,1

**Bảng 3. 10.** Phân bố gen trong cùng 1 chủng ở *A. baumannii* kháng carbapenem

Sự tích lũy gen liên quan đến tính kháng carbapenem	Tần số	Tỷ lệ %
Một gen	3	2,9
Hai gen	13	12,4
<b>Ba gen</b>	<b>84</b>	<b>80</b>
Ba gen có bao gồm <i>ISAbal</i>	82	97,6
Ba gen có bao gồm $bla_{OXA-23}$	76	90,5
Ba gen ( <i>ISAbal</i> + $bla_{OXA-23}$ + $bla_{OXA-51}$ )	74	88,1
<b>Bốn gen (đều có chứa <i>ISAbal</i>)</b>	<b>5</b>	<b>4,8</b>
Bốn gen ( <i>ISAbal</i> + $bla_{OXA-23}$ + $bla_{OXA-51}$ + $bla_{NDM-1}$ )	2	40
Bốn gen ( <i>ISAbal</i> + $bla_{OXA-23}$ + $bla_{OXA-51}$ + $bla_{OXA-58}$ )	1	20
Bốn gen ( <i>ISAbal</i> + $bla_{OXA-58}$ + $bla_{OXA-51}$ + $bla_{NDM-1}$ )	2	40

Tóm lại, các chủng *A. baumannii* đề kháng carbapenem chủ yếu mang 3 nhóm gen liên quan đến tính kháng carbapenem (chiếm 80%). Trong các chủng mang 3 nhóm gen, hầu hết (chiếm 97,6%) các chủng đều mang trình tự ISAbal. Trong số các OXA  $\beta$ -lactamase ở *A. baumannii* đề kháng carbapenem, OXA-51 chiếm nhiều nhất với 97,1%; OXA-23 đứng thứ hai với 79%. Mặt khác, đại diện quan trọng của gen mã hóa carbapenemase lớp B là NDM-1 cũng được ghi nhận xuất hiện ở các chủng *A. baumannii* đề kháng carbapenem trong nghiên cứu này, với tỷ lệ là 13,3%.

### **3.2. Đặc điểm hệ gen, các yếu tố độc lực và gen đề kháng kháng sinh *in-silico* ở các chủng *Acinetobacter baumannii* đặc trưng bằng phương pháp Tin – Sinh học**

Từ Bảng 3.12, chọn 2 chủng *A. baumannii* đặc trưng mang nhiều gen liên quan đến tính kháng carbapenem để tiến hành giải trình tự hệ gen, nhằm nghiên cứu đặc điểm hệ gen, mối quan hệ phát sinh loài và so sánh hệ gen 2 chủng *A. baumannii*. Theo Bảng 3.8, trong 5 chủng mang 4 gen liên quan đến tính đề kháng carbapenem, chọn chủng mang gen quan trọng liên quan đến sự lan truyền tính kháng carbapenem là  $bla_{NDM-1}$ . NDM-1 (New Delhi metallo-beta-lactamase 1) là 1 yếu tố di truyền di động, lan khắp Ấn Độ và các quốc gia lân cận như Pakistan và Bangladesh, mở rộng qua Anh Quốc và lan truyền nhanh chóng tới hầu hết các quốc gia và vùng lãnh thổ trên thế giới. Sự phát tán rộng khắp của những vi khuẩn này đã gây lo lắng bởi vì một số chủng đã đề kháng với hầu hết các kháng sinh ngoại trừ nhóm polymyxin. Tiêu chuẩn thứ 2 được chọn lựa là chủng *A. baumannii* mang gen quan trọng mã hóa cho OXA-58. Theo nghiên cứu của Higgins và cộng sự năm 2009, sự biến nạp  $bla_{OXA-58}$  vào một dòng *A. baumannii* tham chiếu làm gia tăng các mức độ biểu hiện của hệ thống bơm thải AdeABC khiến sinh ra một chủng đề kháng, cho thấy rằng các mức độ đề kháng quan trọng trong lâm sàng ở enzyme này đòi hỏi các cơ chế đề kháng đa dạng. Vì *A. baumannii* sở hữu nhiều cơ chế đề kháng, các dòng của chủng vi khuẩn này mang các biến thể  $bla_{OXA-58}$  được xác định thường biểu hiện sự đề kháng carbapenem ở các mức độ cao.

Do đó, 2 chủng *A. baumannii* được giải trình tự hệ gen ký hiệu là:

+ **DMS06669**: mang 4 gen **ISAbal + bla<sub>OXA-58</sub> + bla<sub>OXA-51</sub> + bla<sub>NDM-1</sub>**.

+ **DMS06670**: mang 4 gen **ISAbal + bla<sub>OXA-58</sub> + bla<sub>OXA-51</sub> + bla<sub>NDM-1</sub>**.

### 3.2.1. Đặc điểm chung của chủng *Acinetobacter baumannii* đặc trưng

#### 3.2.1.1. Đặc điểm đề kháng kháng sinh

**Bảng 3. 11.** Thử nghiệm nhạy cảm kháng sinh của DMS06669 và DMS06670

Tên kháng sinh	MIC của DMS06669 (µg/ml)	MIC của DMS06670 (µg/ml)
Colistin	≤1	≤1
Tigecycline	≤1	2
Ciprofloxacin	>2	>2
Levofloxacin	4	>4
Ceftriaxone	>4	>4
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>4/76	>4/76
Imipenem	>8	>8
Meropenem	>8	>8
Gentamicin	>8	>8
Cefazolin	>8	>8
Ampicillin/Sulbactam	>16/8	>16/8
Ceftazidime	>16	>16
Cefepime	>16	>16
Cefoxitin	>16	>16
Aztreonam	>16	>16
Amikacin	>32	≤8
Cefoperazone/Sulbactam	>32/8	>32/8
Piperacillin/Tazobactam	>64/4	>64/4
Ticarcillin/Clavulanic acid	>128/2	>128/2

#### 3.2.1.2. Đặc điểm hệ gen

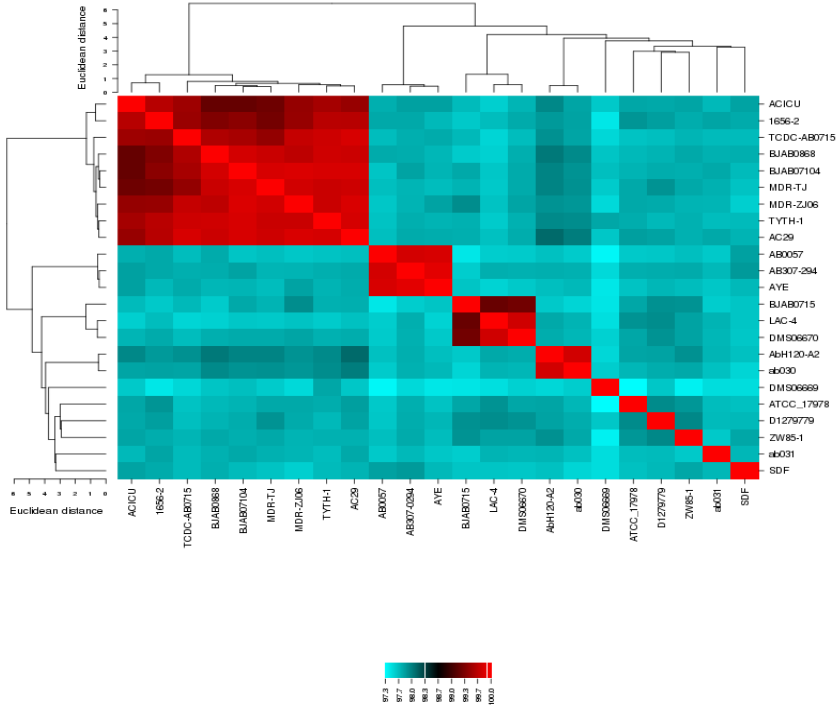
**Bảng 3. 12.** Kết quả lắp ráp, chú giải hệ gen *A. baumannii* DMS06669 & DMS06670

Đặc điểm	DMS06669	DMS06670
Pair-end raw reads	4,750,865	4,998,333
Pair-end clean reads	3,768,594 (79.32%)	3,964,392 (79.31%)
Length of total draft genome length (bp)	4,369,281	3,860,520
Scaffolds	24	16
Length of scaffold (N50)	4,207,939	3,815,999

GC content (%)	38.91	38.94
Number of coding sequences	4,101	3,643
tRNAs	63	65
rRNAs	3	3
CRISPR sequences	2 <sup>a</sup>	3
Họ protein gây bệnh	632	622

### 3.2.2. Phân tích phát sinh loài toàn bộ hệ gen của các chủng *Acinetobacter baumannii* đặc trưng

Phân tích phát sinh loài cho thấy, chủng *A. baumannii* DMS06669 là một nhóm 6 chủng gồm ATCC\_17978, D1279779, ZW85-1; ab031 và SDF. Trong khi đó, chủng DMS06670 ở cùng một nhánh với LAC-4 và BJA0715 (Hình 3.8).



**Hình 3. 1.** Cây phát sinh loài của *Acinetobacter baumannii* DMS06669; DMS06670 và 21 chủng *A. baumannii* hiện hành trong cơ sở dữ liệu KEGG dựa trên các giá trị trung bình độ tương đồng nucleotide (ANI).

### 3.2.3. Phân tích các gen liên quan đến độc lực và kháng kháng sinh in-silico ở các chủng *Acinetobacter baumannii* đặc trưng

#### 3.2.3.1. Xác định các gen liên quan đến độc lực của vi khuẩn

Bằng cách sử dụng PathogenFinder 1.1, dự đoán được xác suất để chủng *A. baumannii* DMS06669 và DMS06670 là một tác nhân gây bệnh ở người tương ứng là 85,8% và 85,3%. Kết quả chi tiết được liệt kê trong Bảng phụ lục 2. Tổng cộng có 632 và 622 họ protein gây bệnh tương đồng được mã hóa bởi các trình tự hệ gen hoàn chỉnh của chủng *A. baumannii* DMS06669 và DMS06670.

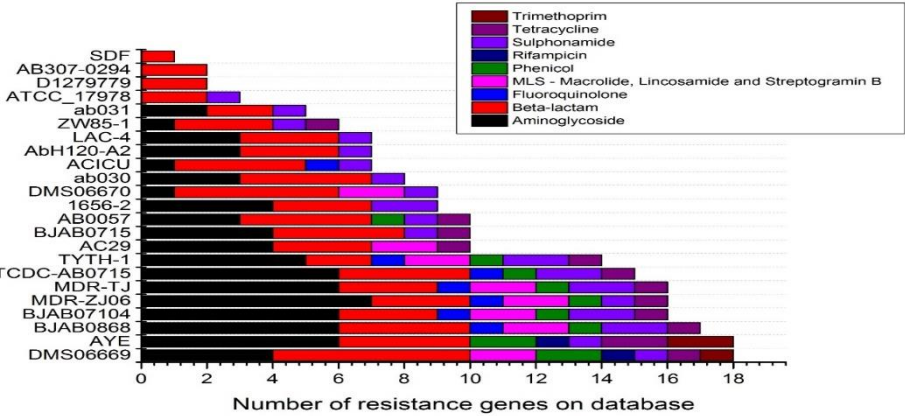
#### 3.2.3.2. Xác định các vùng tiền thể thực khuẩn (prophage) ở *A. baumannii*

Các vùng tiền thể thực khuẩn được xác định bằng PHAST. Tiến hành phân tích các vùng tiền thể thực khuẩn trong hệ gen của 2 chủng *A. baumannii* DMS06669 và DMS06670 và xác định được cả 2 chủng có chứa 1 số vùng tiền thể thực khuẩn (prophage) (Bảng 3.17). Các trình tự giống phage (phage-like sequences) được giả thuyết là giúp tăng cường khả năng bám dính của tế bào vi khuẩn vào tế bào chủ (người) và có khả năng tích lũy đề kháng với kháng sinh. Điều này giúp vi khuẩn sống sót trong các môi trường mới và trở thành các tác nhân gây bệnh.

**Bảng 3. 17.** Các tiền thể thực khuẩn ở *A. baumannii* DMS06669 và DMS06670

Chủng	V ù n g	Chiều dài vùng (kb)	Tính toàn vẹn	CDS	Chức năng đặc trưng
DMS06669	1	26.7	Nguyên vẹn	44	lysin, transposase, terminase, portal, head, capsid
	2	25.3	Không nguyên vẹn	10	Integrase
	3	37.3	Nguyên vẹn	55	terminase, plate, tail, head, virion, portal
	4	45.2	Nguyên vẹn	64	portal, tail, recombinase, terminase, lysin, head
DMS06670	1	21	Không nguyên vẹn	22	integrase, tail
	2	4	Không nguyên vẹn	30	integrase, capsid

3.2.3.3. Khai thác kết quả liên quan đến kháng kháng sinh in-silico



**Hình 3. 2.** Sự đề kháng kháng sinh ở chủng *A. baumannii* DMS06669; DMS06670 và 21 chủng *Acinetobacter baumannii* hiện hành

**Bảng 3. 13.** Ô gen đề kháng kháng sinh ở *A. baumannii* DMS06669, DMS06670

Gen đã dự đoán	Gen kháng	Lớp kháng sinh bị kháng	Tương đồng (%)
DMS06669_scf_4_1	<i>aadA16</i>	Aminoglycoside	99,65
DMS06669_scf_2_1	<i>aadB</i>	Aminoglycoside	100
DMS06669_scf_23_3	<i>aadA1</i>	Aminoglycoside	99,87
DMS06669_scf_22_2	<i>rmtB</i>	Aminoglycoside	100
DMS06669_scf_2_2	<i>bla<sub>VEB-7</sub></i>	Beta-lactam	99,89
DMS06669_scf_23_2	<i>bla<sub>OXA-10</sub></i>	Beta-lactam	100
DMS06669_scf_18_1	<i>bla<sub>OXA-58</sub></i>	Beta-lactam	100
DMS06669_scf_1_2828	<i>bla<sub>ADC-25</sub></i>	Beta-lactam	96,35
DMS06669_scf_11_9	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	Beta-lactam	100
DMS06669_scf_1_1731	<i>bla<sub>OXA-64</sub></i>	Beta-lactam	100
DMS06669_scf_23_1	<i>cmlA1</i>	Phenicol	99,13
DMS06669_scf_21_2	<i>floR</i>	Phenicol	98,35
DMS06669_scf_5_1	<i>sul1</i>	Sulphonamide	100
DMS06669_scf_8_3	<i>tet(39)</i>	Tetracycline	99,91
DMS06669_scf_13_10	<i>mph(E)</i>	Macrolide	100
DMS06669_scf_13_11	<i>msr(E)</i>	Macrolide, Lincosamide và Streptogramin B	100



DMS06669_scf_16_1	ARR-3	Rifampicin	100
DMS06669_scf_4_2	<i>dfrA27</i>	Trimethoprim	100
Gen đã dự đoán	Gen kháng	Lớp kháng sinh bị kháng	Tương đồng (%)
DMS06670_ctg_47	<i>aac(3)-IId</i>	Aminoglycoside	99.88
DMS06670_ctg_45	<i>bla<sub>CARB-2</sub></i>	Beta-lactam Alternate name; PSE-1, blaP1b	100.00
DMS06670_ctg_54	<i>bla<sub>OXA-58</sub></i>	Beta-lactam	100.00
DMS06670_ctg_1	<i>bla<sub>ADC-25</sub></i>	Beta-lactam	96.53
DMS06670_ctg_8	<i>bla<sub>OXA-68</sub></i>	Beta-lactam	100.00
DMS06670_ctg_41	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	Beta-lactam	100.00
DMS06670_ctg_25	<i>mph(E)</i>	Macrolide	100.00
DMS06670_ctg_25	<i>msr(E)</i>	Macrolide, Lincosamide và Streptogramin B	100.00
DMS06670_ctg_45	<i>sull</i>	Sulphonamide	100.00

Bảng công cụ ResFinder 1.1, Bảng 3.18 liệt kê các gen có liên quan đến sự đề kháng của chủng *A. baumannii* DMS06669 đối với các aminoglycoside, betalactam, macrolide, lincosamide streptogramin B, phenicol, rifampicin, sulphonamide, tetracycline, trimethoprim và chủng DMS06670 đối với aminoglycoside, beta-lactam, macrolide, lincosamide, streptogramin B và sulphonamide.

Chủng *A. baumannii* DMS06669 chiếm số lượng lớp kháng kháng sinh cao nhất trong tổng số 23 chủng *A. baumannii* từ việc tìm kiếm trong ResFinder (8/9 lớp kháng sinh, ngoại trừ nhóm fluoroquinolon) (Hình 3.9), tiếp theo là các chủng AYE, BJAB0868, MDR-ZJ06, MDR-TJ và BJAB07104, tất cả đều đã được báo cáo là các chủng đa kháng thuốc.

Có 9 gen được xếp vào nhóm đề kháng với kháng sinh beta-lactamase. Gen *bla<sub>VEB7</sub>* có liên quan đến kháng cephalosporin (cefepime, cefoxitin, ceftazidime, ceftriaxone) và kháng thuốc aztreonam. Điều này phù hợp với phân tích MIC (Bảng 3.13). Năm gen *bla<sub>OXA-10</sub>*, *bla<sub>OXA-58</sub>*, *bla<sub>OXA-64</sub>*, *bla<sub>ADC-25</sub>* và *bla<sub>NDM-1</sub>* được coi là các gen kháng thuốc của nhóm kháng sinh carbapenems (meropenem và imipenem). Trong số đó, *bla<sub>OXA-64</sub>* chưa bao giờ công bố trước đây trong các

chủng *A. baumannii*. Ngoài ra, cả gen  $bla_{NDM-1}$  và  $bla_{OXA-58}$  tìm thấy trong DMS06669 chưa bao giờ được báo cáo trong cùng một chủng trước đó. Ở chủng DMS06670, có 1 gen mới là  $bla_{CARB-2}$  chưa bao giờ công bố trước đây trong các chủng *A. baumannii*.

### 3.2.3.4. Những trình tự chèn (IS) ở *A. baumannii* DMS06669 và DMS06670

**Bảng 3. 14.** Những trình tự chèn (IS) ở *Acinetobacter baumannii* DMS06669

STT	Trình tự chèn (IS)	Họ IS	Nhóm	Nguồn gốc	Score (bit)	E-value
1	<b>ISAbal</b>	IS4	IS10	<i>A. baumannii</i>	1223	1e-187
2	ISAbal2	IS3	IS51		95,6	3e-17
3	<b>ISAbal3</b>	IS1	IS51		347	2e-93
4	ISAbal5	IS5	IS903		95,6	1e-17
5	ISAbal7	IS5	IS903		52,0	4e-04
6	ISAbal12	IS5	IS903		394	1e-107
7	ISAbal13	IS5	IS903		115	2e-23
8	ISAbal14	IS3	IS150		54	7e-05
9	ISAbal16	IS66	IS903		492	6e-137
10	ISAbal17	IS66	IS903		424	1e-116
11	ISAbal18	IS3	IS51		73,8	1e-10
12	ISAbal19	IS3	IS51		105	3e-20
13	ISAbal21	IS3	IS3		97,6	8e-18
14	ISAbal22	IS3	IS3		79,8	2e-12
15	ISAbal25	IS66	IS903		492	6e-137
16	ISAbal29	IS3	IS51		85,7	3e-14
17	ISAbal32	ISNCY	IS1202		97,6	5e-19
18	ISAbal34	IS3	IS51		95,6	3e-17
19	ISAbal40	IS5	IS903		113	6e-23
20	ISAbal43	ISL3	ISAZba1		168	4e-41

Các trình tự chèn ở *A. baumannii* đóng vai trò quan trọng để vi khuẩn tăng cường mức độ đề kháng kháng sinh và tăng khả năng lan truyền tính kháng giữa các chủng vi khuẩn với nhau.

**Bảng 3. 15.** Những trình tự chèn (IS) ở *Acinetobacter baumannii* DMS06670

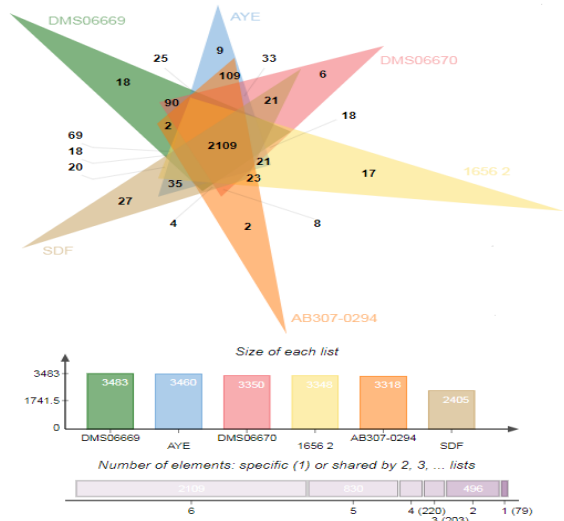
STT	Trình tự chèn (IS)	Họ IS	Nhóm	Nguồn gốc	Score (bit)	E-value
1	<b>ISAbal</b>	IS4	IS10		305	3e-81
2	ISAbal2	IS3	IS51		103	2e-19
3	<b>ISAbal3</b>	IS1	IS51		973	0,001

4	IS <i>Aba7</i>	IS5	IS903	<i>A. baumannii</i>	52,0	5e-04
5	IS <i>Aba8</i>	IS21	IS1202		69,9	3e-10
6	IS <i>Aba18</i>	IS3	IS51		696	1e-187
7	IS <i>Aba18</i>	IS3	IS51		79,8	2e-12
8	IS <i>Aba19</i>	IS3	IS51		101	6e-19
9	IS <i>Aba21</i>	IS3	IS3		83,8	1e-13
10	IS <i>Aba22</i>	IS3	IS3		69,9	2e-09
11	IS <i>Aba26</i>	IS256	ISPna2		337	6e-90
12	IS <i>Aba27</i>	IS5	ISL2		345	4e-93
13	IS <i>Aba29</i>	IS3	IS51		91,7	6e-16
14	IS <i>Aba32</i>	ISNCY	IS1202		147	2e-33
15	IS <i>Aba33</i>	IS4	IS10		509	1e-142
16	IS <i>Aba34</i>	IS3	IS51		115	4e-23
17	IS <i>Aba125</i>	IS30	ISPna2		109	1e-21

### 3.2.4. Phân tích gen ortholog ở các chủng *A. baumannii* đặc trưng

Các gen ortholog là các cụm gen ở các loài khác nhau đã tiến hóa theo gốc dọc từ

**Hình 3. 3.** So sánh hệ protein giữa các chủng *A. baumannii*: DMS06669; DMS06670; AYE, SDF, 1656-2, AB307-0294. Biểu đồ Venn và biểu đồ thanh đại diện cho số lượng các gen orthologous trực giao và duy nhất của mỗi chủng



một gen tổ tiên. Sự so sánh các bộ gen của các cụm ortholog ở các phân lập khác nhau làm sáng tỏ về cấu trúc, chức năng của gen và sự tiến hóa phân tử của các bộ gen. Các phân tích COG của 2 chủng *A. baumannii* DMS06669 và DMS06670 được so sánh với 4 bộ gen khác nhau (bao gồm các chủng *A. baumannii* SDF; AYE; AB307-0294 và 1656-2) có sự khác biệt về hệ gen đề

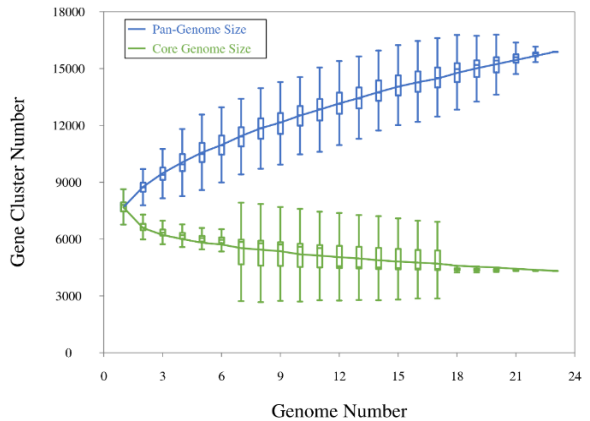
kháng với kháng sinh (Hình 3.10); trong đó, dựa trên hình 3.9, DMS06669 và AYE có số lượng gen kháng thuốc kháng sinh cao nhất; DMS06670 và 1656-2 có số lượng gen kháng thuốc trung bình; AB307-0294 và SDF có số lượng gen kháng kháng sinh thấp nhất.

Phân tích cho thấy *A. baumannii* DMS06669 và DMS06670 chứa lần lượt 4.101 và 3.643 protein; 3.483 và 3.350 COG; 573 và 273 các singleton (gen/ protein đặc trưng mỗi loài). Trong số 3.483 và 3.350 COG ở chủng DMS06669 và DMS06670, tất cả 6 chủng đều chia sẻ 2.109 COG và lần lượt tương ứng, 18 và 6 COG chỉ có trong bộ gen DMS06669 và DMS06670. Các COG duy nhất tồn tại trong DMS06669 và AYE liên quan đến các chức năng: đáp ứng với kháng sinh (GO:0046677), hoạt tính aminoglycoside 2''-nucleotidyltransferase (GO:0008871), đáp ứng với methotrexate (GO:0031427), quá trình sinh tổng hợp glycine (GO:0006545), hoạt tính thủy phân – tác động lên liên kết carbon-nitrogen (những không phải liên kết peptide) trong các mạch amide thẳng (GO:0016811), hoạt tính khử dihydrofolate (GO:0004146), quá trình dị hóa kháng sinh (GO:0017001), hoạt tính aminoglycoside 3''-nucleotidyltransferase (GO:0009012) và quá trình dị hóa nucleotide (GO:0009165). Mặt khác, DMS06670 và 1656-2 chứa các COG duy nhất liên quan tới các gen có các chức năng: quá trình dị hóa nicotin (GO:0019608), điều hòa kích thích quá trình chuyển hóa isoprenoid (GO:0045828), hoạt tính men oxi hóa khử (tác động lên các nhóm nhận CH-NH<sub>2</sub> với oxygen là chất cho điện tử; GO:0016641) và quá trình sinh tổng hợp isoprenoid (GO:0008299). Phân tích các chủng AB307-0294 và SDF không cung cấp thêm bất kỳ các gen đặc trưng đáng kể nào khác. Ý nghĩa đại diện của các gen đơn lẻ ở 6 chủng *A. baumannii* này cho thấy các nhóm protein ortholog đóng vai trò quan trọng với việc duy trì sự đề kháng đa kháng sinh bên trong các chủng vi khuẩn đề kháng kháng sinh mức độ cao.

### 3.2.5. Phân tích pan-genome ở các chủng *A. baumannii* đặc trưng

Để khảo sát thông tin pan-genome của *A. baumannii*, tiến hành xây dựng các biểu

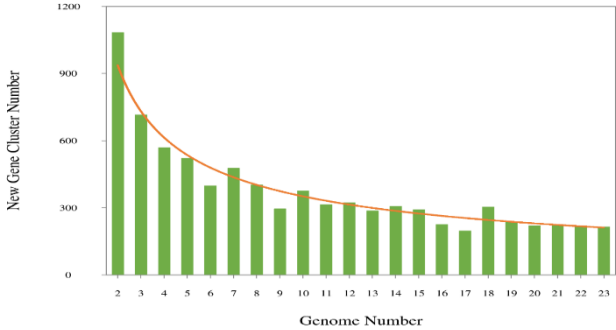
**Hình 3. 4.** Tổng số gen trong pan-genome (màu xanh dương) và core-genome (màu xanh lá cây) được biểu diễn bằng hàm số lượng của hệ gen được tuần tự thêm vào (n=23 hệ gen). Biểu đồ hộp biểu thị tỷ lệ % thứ 25 và thứ 75 với các trung vị được biểu thị dưới dạng đường nằm ngang và râu (whisker) nằm ở các phần trăm thứ 10 và thứ 90.



đồ số lượng tổng các gen, các gen chung và các gen mới khác biệt về chức năng trong số các hệ gen đã được giải trình tự (Hình 3.11). Các gen chung được định nghĩa là các loci chuẩn được bảo tồn trên toàn bộ nhóm dữ liệu, tức là các gen hiện diện một lần duy nhất trong mỗi chủng. Các gen mới chứa các gen đặc trưng chủng và được chia sẻ 1 phần. Tổng số các gen bao gồm toàn bộ các gen thành viên. Pan-genome của *A. baumannii* gồm tổng cộng 15.883 gen, trong khi hệ gen chung và gen mới lần lượt là 4.321 và 11.562 gen. Pan-genome *Acinetobacter baumannii* cho thấy nét đặc trưng của một pan-genome “mở”. Minh họa từ Hình 3.11 cho thấy, kích thước của pan-genome tăng lên không ngừng bằng việc tích lũy thêm các hệ gen mới. Trong 23 chủng *A. baumannii* được phân tích, cho thấy sự cần thiết cập nhật thêm trình tự các chủng để thu thập thành gen hoàn chỉnh vào pan-genome từ đó biểu đồ kích thước hệ gen gia tăng liên tục bằng cách thêm hệ gen mỗi chủng vào pan-genome tổng. Bên cạnh đó, kích thước pan-genome cũng lớn hơn (gấp 3 lần) so với số lượng gen trung bình tìm thấy trong hệ gen *Acinetobacter baumannii* DMS06669. Đường cong liên tục biểu diễn kích thước pan-genome (xanh dương) phù hợp với mô hình hồi quy Power-law ( $r^2 = 0,999$ ), trong khi đường cong liên tục biểu diễn kích thước core-genome (xanh lá cây) phù hợp với mô hình hồi quy theo hàm mũ ( $r^2 = 0,964$ ). Những kết quả này phù

hợp với các báo cáo về phân tích pan-genome *Acinetobacter baumannii* trước đây. Hơn nữa, số lượng gen mới từ phân tích pan-genome cho thấy sự gia tăng tới 211 gen mới được tìm thấy tương ứng trong 23 hệ gen (Hình 3.12). Đường cong hệ gen sử dụng mô hình hồi quy Power-law cho thấy kết quả này cũng phù hợp

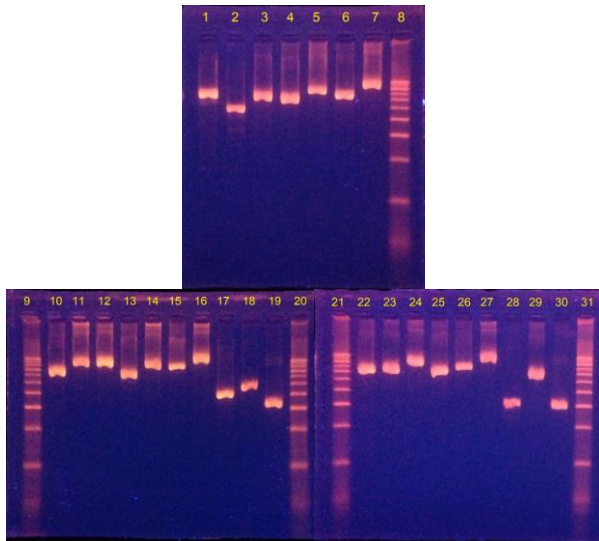
**Hình 3. 5.** Phân tích gen đặc trưng chủng đối với 23 hệ gen *A. baumannii*. Số lượng các gen mới đặc trưng chủng góp phần vào nhóm gen mỗi trình tự chủng được thêm vào được biểu diễn bằng hàm số lượng các chủng ( $n=23$ ).



với các quan sát ở trên về pan-genome là khá mở ( $B_{pan} = 0,44$ ).

**3.3. Phân lập các gen đề kháng kháng sinh ở các chủng *Acinetobacter baumannii* đặc trưng**

**3.3.1. PCR phân lập các gen đề kháng kháng sinh ở các chủng *Acinetobacter baumannii* đặc trưng**



**Hình 3. 6.** PCR phân lập các gen đề kháng kháng sinh ở 2 chủng *A. baumannii* DMS06669 và *Acinetobacter baumannii* DMS06670.

1. *aadA16* (846bp) 2. *aadB* (534bp) 3. *aadA1* (792bp) 4. *rmtB* (756bp)  
5. *bla<sub>VEB7</sub>* (900bp) 6. *bla<sub>OXA10</sub>* (801bp) 7. *bla<sub>ADC25</sub>* (1152bp) 8, 9. Ladder  
10. *bla<sub>OXA64</sub>* (825bp) 11. *cmlA1* (1260bp) 12. *floR* (1215bp) 13. *sul1* (840bp)  
14. *tet(39)* (1120bp) 15. *mph(E)* (885bp) 16. *msr(E)* (1476bp) 17. ARR-3 (453bp)  
18. *dfxA27* (474bp) 19. 16S-DMS06669 20, 21, 31. Ladder 22. *aac(3)-IId* (861bp)  
23. *bla<sub>CARB2</sub>* (915bp) 24. *bla<sub>ADC25</sub>* (1152bp) 25. *bla<sub>OXA68</sub>* (825bp) 26. *mph(E)* (885bp)  
27. *msr(E)* (1476bp) 28. *sul1* (348bp) 29. *sul1* (840bp) 30. 16S-DMS06670

### 3.3.2. Sanger cải tiến xác nhận trình tự các gen đề kháng kháng sinh ở 2 chủng *Acinetobacter baumannii* DMS06669 và DMS06670

Trong các gen đề kháng kháng sinh *in-silico* ở hai chủng *A. baumannii* DMS06669 và DMS06670, chỉ có một gen (*aac(3)-IId* ở chủng *A. baumannii* DMS06670) là không tìm được chủng vi khuẩn tương đồng có chứa gen *aac(3)-IId*. Như vậy, 22/23 gen *in-silico* đã được phân lập *in-vitro* bằng PCR và đã được xác nhận lại bằng phương pháp Sanger cải tiến.

## CHƯƠNG 4 KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 4.1. Kết luận

*Về đặc điểm kháng kháng sinh, tỷ lệ các gen liên quan đến kháng carbapenem và tác dụng diệt khuẩn in-vitro của các phối hợp kháng sinh lên Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* trong nghiên cứu kháng 100% với hầu hết các kháng sinh thử nghiệm. Trong nhóm aminoglycoside, *A. baumannii* kháng 100% với gentamicin; 7,5% với tobramycin và 10,4% với amikacin. *A. baumannii* còn nhạy 26,4% với Bactrim. Hai kháng sinh còn nhạy cảm với tỷ lệ rất cao, tigecycline (tỷ lệ nhạy cảm là 99,1%) và colistin (tỷ lệ nhạy cảm là 100%).

Các kiểu phối hợp kháng sinh giữa meropenem/colistin và meropenem/rifampicin có tác dụng hiệp đồng và cộng lực với tỷ lệ rất cao, lần lượt là 94,3% và 81,9% lên các chủng *A. baumannii*. Tuy nhiên, tổ hợp tigecycline/colistin chỉ cho tác dụng hiệp đồng và cộng lực với tỷ lệ là 36,2%.

Các chủng *A. baumannii* đề kháng carbapenem chủ yếu mang 3 nhóm gen liên quan đến tính kháng carbapenem (chiếm 80%). Trong các chủng mang 3 nhóm gen, hầu hết (chiếm 97,6%) các chủng đều mang trình tự ISAbal. Trong số các OXA  $\beta$ -lactamase ở *A. baumannii* đề kháng carbapenem, OXA-51 chiếm nhiều nhất với 97,1%; OXA-23 đứng thứ hai với 79%. Mặt khác, đại diện quan trọng của gen mã hóa carbapenemase lớp B là NDM-1 cũng được ghi nhận xuất hiện ở các chủng *A. baumannii* đề kháng carbapenem trong nghiên cứu này, với tỷ lệ là 13,3%.

*Về đặc điểm hệ gen, các yếu tố độc lực và gen đề kháng kháng sinh in-silico ở 2 chủng A. baumannii DMS06669 và DMS06670 bằng phương pháp Tin – Sinh học*



Hệ gen *A. baumannii* DMS06669 và DMS06670 có tương ứng 24 và 16 scaffold, kích thước lần lượt là 4.207.939bp và 3.815.999bp.

Đặc điểm hệ gen của *A. baumannii* DMS06669 gồm có 4101 trình tự mã hóa, 18 gen kháng kháng sinh (gồm 8 gen này chưa từng được xác định ở 1 chủng *A. baumannii*), 4 tiền thể thực khuẩn (3 hoàn chỉnh và 1 không hoàn chỉnh), 20 trình tự chèn (ISAb), 573 protein đặc trưng loài.

Đặc điểm hệ gen của *A. baumannii* DMS06670 gồm có 3643 trình tự mã hóa, 9 gen kháng kháng sinh (gồm gen *bla*<sub>CARB-2</sub> chưa từng được xác định ở *A. baumannii*), 2 thể thực khuẩn không hoàn chỉnh, 17 trình tự chèn (ISAb), 273 protein đặc trưng loài.

Chủng *A. baumannii* DMS06669 phát sinh loài trong 1 nhóm 5 thành viên (ATCC\_17978; D1279779; ZW85-1; ab031 và SDF). Chủng *A. baumannii* DMS06670 phát sinh loài cùng nhánh với các chủng LAC-4 và BJBAB0715.

Các nhóm protein ortholog đóng vai trò quan trọng với việc duy trì sự đề kháng đa kháng sinh bên trong hai chủng vi khuẩn đề kháng kháng sinh mức độ cao. Phân tích pan-genome 23 hệ gen đã có sẵn (bao gồm hệ gen DMS06669 và DMS06670) có sự gia tăng 211 gen, cho thấy sự cần thiết tiếp tục nghiên cứu giải trình tự hệ gen *A. baumannii* để hiểu biết đầy đủ nhất về đặc tính các gen (kháng thuốc, gây độc lực) và vai trò các nhóm protein duy nhất trong mỗi chủng.

***Về phân lập các gen đề kháng kháng sinh từ kết quả in-silico ở 2 chủng A. baumannii DMS06669 và DMS06670 bằng phương pháp thực nghiệm Sinh học Phân tử***

PCR đã giúp phân lập *in-vitro* 19 gen kháng thuốc của hai chủng DMS06669; và DMS06670 và được xác nhận lại bằng phương pháp Sanger cải tiến.

## 4.2. Kiến nghị

Thử nghiệm phối hợp meropenem/tigecycline và rifampicin/colistin để đánh giá toàn diện hơn tác dụng hiệp đồng và cộng lực của các tổ hợp giữa 3 kháng sinh còn nhạy cảm trung bình, cao và rất cao với các chủng *A. baumannii* đề kháng carbapenem.

Nghiên cứu thời gian diệt khuẩn trên mô hình động vật thí nghiệm (mô hình chuột viêm phổi, mô hình thỏ viêm màng não) để đánh giá tác dụng hiệp đồng và cộng lực của các phối hợp kháng sinh *in-vivo* lên *A. baumannii* kháng carbapenem.

Phân lập và khảo sát các gen liên quan đến độc lực vi khuẩn, gen mã hóa các vùng tiền thể thực khuẩn, các protein đặc trưng loài để nghiên cứu sâu hơn về cơ chế sinh bệnh mức phân tử và các protein gây bệnh đặc trưng loài cho sản xuất vaccine.

Phân lập và phân tích biểu hiện của các trình tự chèn IS*Aba* ở *A. baumannii* để hiểu rõ hơn mức độ kháng thuốc ở mức phân tử của *Acinetobacter baumannii*.

## CÁC ĐÓNG GÓP CỦA ĐỀ TÀI

1. Về tỷ lệ đề kháng kháng sinh của *A. baumannii*: ngoài kết luận *A. baumannii* đề kháng rất cao với hầu hết các kháng sinh thử nghiệm và nhạy cảm 100% với colistin như nhiều công trình nghiên cứu khác, *A. baumannii* trong nghiên cứu này vẫn còn nhạy cảm thấp (nhạy 26,4%) với kháng sinh Bactrim, nhạy cảm trung bình với rifampicin (nhạy 59,5%) và nhạy cảm rất cao với tigecycline (nhạy 99,1%).
2. Kết quả nghiên cứu cũng đưa ra một khuyến cáo khác biệt là việc phối hợp tigecycline/colistin ít có hiệu quả hiệp đồng và cộng lực *in-vitro* lên *A. baumannii* đề kháng carbapenem hơn các tổ hợp meropenem/colistin và meropenem/rifampicin.
3. Dữ liệu về các gen liên quan đến tính kháng carbapenem ở *A. baumannii* giúp bổ sung thêm các thông tin về tình hình đề kháng carbapenem ở mức kiểu gen tại Đồng Nai.
4. Có 9 gen đề kháng kháng sinh chưa từng được công bố trong 1 chủng *A. baumannii* trước đây, trong đó có 2 gen mới liên quan đến đề kháng nhóm kháng sinh beta-lactam. Dữ liệu giải trình tự hệ gen cũng phát hiện các vùng tiền thể thực khuẩn (prophage) ở *A. baumannii*, các protein đặc trưng loài và các yếu tố độc lực có thể là cơ sở để nghiên cứu tiếp theo về cơ chế sinh bệnh học phân tử và nghiên cứu tìm vaccine đối với *A. baumannii*.
5. Cung cấp được 19 trình tự gen kháng thuốc ở *A. baumannii*, trong đó có trình tự gen *bla*<sub>CARB-2</sub> chưa từng được phân lập ở *A. baumannii*. Đây là một gen mã hóa beta-lactamase được chứng minh là 1 yếu tố quyết định tính kháng kháng sinh nhóm beta-lactam.