

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



LƯU THỊ VŨ NGÀ

**MỘT SỐ GEN MÃ HÓA
CARBAPENEMASE VÀ MỐI LIÊN QUAN
VỚI MỨC ĐỘ KHÁNG CARBAPENEM
CỦA ACINETOBACTER BAUMANNII
TẠI VIỆT NAM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2021

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

LƯU THỊ VŨ NGA

**MỘT SỐ GEN MÃ HÓA
CARBAPENEMASE VÀ MỐI LIÊN QUAN
VỚI MỨC ĐỘ KHÁNG CARBAPENEM
CỦA ACINETOBACTER BAUMANNII
TẠI VIỆT NAM**

Chuyên ngành : Vi sinh Y học

Mã số : 62720115

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học

1. PGS. TS. Nguyễn Vũ Trung
2. TS. Phạm Hồng Nhung

HÀ NỘI - 2021

LỜI CẢM ƠN

Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin chân thành cảm ơn:

Các thầy cô trong Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo Sau đại học và Bộ môn Vi sinh Trường Đại học Y Hà Nội đã tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp tôi trong suốt quá trình học tập, thực hiện luận án này.

PGS. TS. Nguyễn Vũ Trung, Trưởng Bộ môn Vi sinh Trường Đại học Y Hà Nội, Phó Giám đốc Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương, người thầy đã tận tình ủng hộ, động viên và hướng dẫn tôi trong suốt quá trình học tập nghiên cứu để hoàn thành bản luận án này.

TS Phạm Hồng Nhung, Phó Trưởng Bộ môn Vi sinh Trường Đại học Y Hà Nội, Phó trưởng khoa Vi sinh Bệnh viện Bạch Mai, người cô đã luôn có những ý tưởng hay về phương pháp nghiên cứu giúp tôi hoàn thành bản luận án này.

TS Trần Huy Hoàng, Trưởng phòng Kháng sinh, Phó trưởng khoa Vi khuẩn Viện vệ sinh Dịch tễ Trung ương đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi thực hiện nghiên cứu và có những ý kiến đóng góp quý báu giúp tôi hoàn thành bản luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn các Giáo sư, Phó giáo sư, Tiến sĩ thành viên hội đồng chấm luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban giám đốc, tập thể cán bộ nhân viên Khoa Vi sinh Bệnh viện Thanh Nhàn đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn tập thể cán bộ nhân viên Khoa Vi khuẩn Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án.

Xin chân thành cảm ơn các đồng nghiệp, bạn bè đã động viên khuyến khích và giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án.

Đặc biệt tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình bố, mẹ, anh, em và những người thân nhất là chồng và các con tôi đã khích lệ và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Tôi xin ghi nhận những tình cảm và công lao ấy.

Hà Nội, ngày tháng năm 2021

Nghiên cứu sinh

Lưu Thị Vũ Nga

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là LƯU THỊ VŨ NGA, nghiên cứu sinh khóa 34, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Vi sinh y học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của Thầy PGS.TS. Nguyễn Vũ Trung và Cô TS. Phạm Hồng Nhung.

2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày tháng năm 2021
Người viết cam đoan

Lưu Thị Vũ Nga

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên đầy đủ
AK	Amikacin
BV	Bệnh viện
CAP	Viêm phổi cộng đồng (community-acquired pneumonia)
CAZ	Ceftazidime
CEP	Cephalosporin
CHDL	Enzym beta-lactamase nhóm D thủy phân carbapenem (carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases)
CIM	Kỹ thuật bất hoạt carbapenem (Carbapenem Inactivation Method)
CLSI	Viện chuẩn thức xét nghiệm lâm sàng Hoa Kỳ (Clinical and Laboratory Standards Institute)
CO	Colistin
CPM	Cefepime
CRAB	<i>A. baumannii</i> kháng carbapenem (Carbapenem-Resistant <i>A. baumannii</i>)
CSAB	<i>A. baumannii</i> nhạy cảm với carbapenem (Carbapenem- susceptible <i>A. baumannii</i>)
DOR	Doripenem
EUCAST	Ủy ban châu Âu về thử nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
I	Trung gian (intermediate)
ICU	Đơn vị chăm sóc tích cực (Intensive care unit)
IPM	Imipenem
IS	Trình tự chèn (insertion sequences)
KS	Kháng sinh

LEV	Levofloxacin
LPS	Lipopolysaccharide
MBL	Beta-lactamase nhóm B (Metallo- β -lactamases)
MDR	Đa kháng kháng sinh (Multi-drug resistant)
MEM	Meropenem
MH	Môi trường Muller – Hinton
MHT	Thử nghiệm Modified Hodge test
MI	Minocyclin
NCBI	Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia, Hoa Kỳ (National Center for Biotechnology Information).
NDM-1	New Delhi metallo-beta-lactamase 1
NKBV	Nhiễm khuẩn bệnh viện
NST	Nhiễm sắc thể
Omp	Protein màng ngoài (outer membrane protein)
OXA	Oxacillinase
PBPs	Các protein gắn penicilin (Penicillin-Binding Proteins)
PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp (Polymerase Chain Reaction)
PDR	Toàn kháng kháng sinh (Pandrug resistant).
R	Đề kháng (resistant)
RI	Cụm gen kháng (Resistance island)
S	Nhạy cảm (susceptible)
SMART	Nghiên cứu xu hướng đề kháng kháng sinh (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends)
THT	Thử nghiệm Triton-Hodge test
TSB	Môi trường canh thang dinh dưỡng (Trypto-casein soy broth)
VAP	Viêm phổi liên quan đến thở máy (Ventilator-associated pneumonia)
XDR	Đề kháng mở rộng (Extensively drug resistant)

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1. TỔNG QUAN	3
1.1. KHÁNG SINH NHÓM CARBAPENEM.....	3
1.1.1. Cấu trúc của kháng sinh nhóm carbapenem	3
1.1.2. Cơ chế tác động của carbapenem	4
1.2. ACINETOBACTER BAUMANNII	5
1.2.1. Đặc điểm sinh học của <i>A. baumannii</i>	5
1.2.2. Các yếu tố độc lực của <i>A. baumannii</i>	6
1.2.3. Khả năng gây bệnh của <i>A. baumannii</i>	9
1.2.4. Đặc điểm bộ gen liên quan đến độc lực, khả năng gây bệnh và sức đề kháng của <i>A. baumannii</i>	11
1.2.5. Tình hình kháng kháng sinh của <i>A. baumannii</i>	12
1.2.6. Cơ sở di truyền học của sự lan truyền gen đề kháng kháng sinh ở <i>Acinetobacter baumannii</i>	14
1.3. ĐỀ KHÁNG CARBAPENEM DO CARBAPENEMASE Ở <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	17
1.3.1. Phân loại và cơ chế hoạt động của carbapenemase	17
1.3.2. Một số loại carbapenemase lớp B và D thường gặp ở <i>A. baumannii</i> ..	19
1.3.3. Nghiên cứu gen mã hóa carbapenemase và tình hình đề kháng carbapenem của <i>A. baumannii</i> tại Việt Nam	27
1.4. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN KIỂU GEN VÀ CARBAPENEMASE Ở <i>A. BAUMANNII</i>	31
1.4.1. Phương pháp phát hiện gen mã hóa carbapenemase.....	31
1.4.2. Phương pháp kiểu hình phát hiện carbapenemase	32
1.4.3. Phương pháp sinh hóa xác định hoạt tính enzyme carbapenemase ...	37
1.4.4. Một số phương pháp nghiên cứu khả năng lan truyền của các chủng vi khuẩn mang gen đề kháng kháng sinh ở mức độ phân tử..	40
1.5. TÍNH CẤP THIẾT CỦA LUẬN ÁN.....	41

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	42
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	42
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	42
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu	42
2.2.2. Chọn mẫu và cỡ mẫu	42
2.3. SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU	43
2.4. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	44
2.5. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	44
2.5.1. Thu thập và lưu giữ mẫu nghiên cứu.....	44
2.5.2. Kỹ thuật PCR phát hiện gen <i>bla</i> _{OXA-51-like} ở các chủng <i>A. baumannii</i>	44
2.5.3. Kỹ thuật xác định nồng độ ức chế vi khuẩn phát triển (Minimum Inhibitory Concentrations - MIC) của kháng sinh	46
2.5.4. Kỹ thuật PCR phát hiện một số gen mã hóa carbapenemase lớp D và B ở <i>A. baumannii</i>	50
2.5.5. Xác định kiểu gen của vi khuẩn bằng kỹ thuật điện di xung trường (Pulsed-field gel electrophoresis -PFGE)	54
2.5.6. Một số thử nghiệm phát hiện sinh carbapenemase ở <i>A. baumannii</i>	55
2.6. XỬ LÝ VÀ PHÂN TÍCH SỐ LIỆU	59
2.7. ĐẠO ĐỨC NGHIÊN CỨU	60
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	61
3.1. XÁC ĐỊNH NỒNG ĐỘ ỨC CHẾ TỐI THIỂU (MIC) CỦA CARBAPENEM VỚI CÁC CHỦNG <i>A. BAUMANNII</i>	61
3.1.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu.....	61
3.1.2. Xác định MIC của carbapenem với các chủng <i>A. baumannii</i>	62
3.2. PHÁT HIỆN MỘT SỐ GEN MÃ HÓA CARBAPENEMASE LỚP D, B CỦA <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	70
3.2.1. PCR phát hiện một số gen mã hóa carbapenemase.....	70
3.2.2. Xác định mối liên hệ kiểu gen PFGE và kiểu hình đề kháng kháng sinh của các chủng <i>A. baumannii</i>	78

3.3. XÁC ĐỊNH MỐI LIÊN QUAN GIỮA MIC VỚI SỰ XUẤT HIỆN CARBAPENEMASE VÀ GEN MÃ HÓA CARBAPENEMASE	84
Chương 4. BÀN LUẬN	90
4.1. XÁC ĐỊNH NỒNG ĐỘ ỨC CHẾ TỐI THIỂU (MIC) CỦA CARBAPENEM VỚI CÁC CHỦNG <i>A. BAUMANNII</i>	90
4.1.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu	90
4.1.2. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của carbapenem với các chủng <i>A. baumannii</i>	92
4.2. PHÁT HIỆN MỘT SỐ GEN MÃ HÓA CARBAPENEMASE LỚP D, B Ở <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i>	102
4.2.1. PCR xác định một số gen mã hóa carbapenemase lớp D, B	102
4.2.2. Mối liên hệ kiểu gen PFGE và kiểu hình đề kháng kháng sinh của các chủng <i>A. baumannii</i>	106
4.3. MỐI LIÊN QUAN GIỮA MIC VỚI SỰ XUẤT HIỆN CARBAPENEMASE VÀ GEN MÃ HÓA CARBAPENEMASE	109
KẾT LUẬN.....	120
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	121
KIẾN NGHỊ VỀ NHỮNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO	122
DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN TÀI LIỆU THAM KHẢO PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Phân loại beta-lactamase theo chức năng tương quan với cấu trúc phân tử.....	18
Bảng 1.2.	Một số loại carbapenemase lớp D, B thường gặp ở <i>A. baumannii</i> ...	20
Bảng 1.3.	Khả năng thủy phân KS của một số loại OXA ở <i>A. baumannii</i> .	22
Bảng 2.1.	Trình tự môi đặc hiệu cho gen <i>bla</i> _{OXA-51-like}	45
Bảng 2.2.	Nồng độ các kháng sinh pha loãng bậc 2	47
Bảng 2.3.	Các đoạn môi đặc hiệu phát hiện gen kháng carbapenem.....	51
Bảng 3.1.	Phân bố chủng nghiên cứu theo bệnh viện và vùng miền.....	61
Bảng 3.2.	Phân bố số chủng nghiên cứu theo loại mẫu bệnh phẩm	62
Bảng 3.3.	Tỷ lệ <i>A. baumannii</i> đề kháng với carbapenem	62
Bảng 3.4.	Giá trị MIC của kháng sinh với các chủng <i>A. baumannii</i>	63
Bảng 3.5.	Mức độ đề kháng của chủng nghiên cứu theo vùng miền.....	64
Bảng 3.6.	Giá trị MIC của một số kháng sinh ở 2 nhóm CSAB và CRAB ...	65
Bảng 3.7.	Tỷ lệ các chủng <i>A. baumannii</i> dương tính với IS <i>Aba1</i>	71
Bảng 3.8.	Tỷ lệ carbapenemase dương tính theo từng kỹ thuật	85
Bảng 3.9.	Mối liên quan giữa MIC với carbapenemase dương tính theo từng kỹ thuật.....	86
Bảng 3.10.	Mối liên quan giữa gen mã hóa carbapenemase với carbapenemase dương tính theo từng kỹ thuật	87
Bảng 3.11.	Mối liên quan giữa MIC với sự xuất hiện carbapenemase và gen mã hóa carbapenemase ở <i>A. baumannii</i>	88

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 1.1.	Phân bố căn nguyên gây VAP theo mức thu nhập của các nước.	10
Biểu đồ 3.1.	Phân bố tỷ lệ (%) giá trị MIC của carbapenem đối với các chủng <i>A. baumannii</i>	65
Biểu đồ 3.2.	Phân bố tỷ lệ (%) giá trị MIC của cefepime ở 2 nhóm CSAB và CRAB	66
Biểu đồ 3.3.	Phân bố tỷ lệ (%) giá trị MIC của ceftazidime ở 2 nhóm CSAB và CRAB	67
Biểu đồ 3.4.	Phân bố tỷ lệ (%) giá trị MIC của amikacin ở 2 nhóm CSAB và CRAB	67
Biểu đồ 3.5.	Phân bố tỷ lệ (%) giá trị MIC của levofloxacin ở 2 nhóm CSAB và CRAB	68
Biểu đồ 3.6.	Phân bố tỷ lệ (%) giá trị MIC của minocyclin ở 2 nhóm CSAB và CRAB	68
Biểu đồ 3.7.	Phân bố tỷ lệ (%) giá trị MIC của colistin ở 2 nhóm CSAB và CRAB	69
Biểu đồ 3.8.	Tỷ lệ gen mã hóa carbapenemase phát hiện được ở các chủng <i>A. baumannii</i>	70
Biểu đồ 3.9.	Tỷ lệ tổ hợp các gen mã hóa carbapenemase ở các chủng <i>A. baumannii</i>	70
Biểu đồ 3.10.	Tỷ lệ các gen mã hóa carbapenemase ở 2 nhóm CSAB và CRAB.....	76
Biểu đồ 3.11.	Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của các chủng <i>A. baumannii</i> mang 1 và ≥ 2 gen mã hóa carbapenemase.....	76
Biểu đồ 3.12.	Tỷ lệ giá trị MIC của carbapenem giữa 2 nhóm mang <i>bla</i> _{OXA-23-like} có và không có <i>ISAbal/bla</i> _{OXA-23-like}	77
Biểu đồ 3.13.	Tỷ lệ các gen mã hóa carbapenemase ở các chủng <i>A. baumannii</i> theo vùng miền	77
Biểu đồ 3.14.	Tỷ lệ các gen mã hóa carbapenemase ở các chủng <i>A. baumannii</i> theo tuyến bệnh viện	78

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1:	Cấu trúc hóa học của beta-lactam	3
Hình 1.2:	Hình thái và tính chất nhuộm Gram của <i>A. baumannii</i>	6
Hình 1.3:	Thời gian KS được đưa vào sử dụng trên lâm sàng (◆) và thời điểm xuất hiện <i>Acinetobacter</i> đề kháng KS (■)	13
Hình 1.4.	Tn 2006 với <i>ISAbal</i> ở trước và sau của gen <i>bla</i> _{OXA-23} ở <i>A. baumannii</i>	15
Hình 1.5.	Cơ chế tác động của beta-lactamase.....	19
Hình 1.6.	Hình ảnh thử nghiệm MHT.....	33
Hình 1.7.	Sơ đồ quy trình kỹ thuật CIM	34
Hình 1.8.	Kỹ thuật E-test MBL	36
Hình 1.9.	Kỹ thuật khoan giấy hiệp đồng phát hiện MBL.....	36
Hình 1.10.	Hình ảnh thử nghiệm CarbaNP.....	38
Hình 2.1.	Phiến inox 32 giếng và bộ định cây	47
Hình 2.2.	Sơ đồ vị trí mẫu trên phiến inox 32 giếng	48
Hình 2.3.	Hình ảnh đĩa 96 giếng.....	49
Hình 2.4.	Hình ảnh kỹ thuật MHT.....	56
Hình 2.5:	Hình ảnh thử nghiệm CarbaNP	58
Hình 2.6.	Hình ảnh kết quả của kỹ thuật CIM	59
Hình 3.1.	Hình ảnh cho kỹ thuật xác định MIC pha loãng trong thạch	63
Hình 3.2.	Hình ảnh kỹ thuật xác định MIC đối với colistin	69
Hình 3.3.	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR đoạn gen <i>bla</i> _{OXA} của các chủng <i>A. baumannii</i>	71
Hình 3.4.	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR đoạn gen <i>bla</i> _{NDM-1} của các chủng <i>A. baumannii</i>	72
Hình 3.65.	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR đoạn gen <i>ISAbal</i> và <i>ISAbal/bla</i> _{OXA-23} của các chủng <i>A. baumannii</i>	72

Hình 3.6. Kết quả đại diện so sánh giải trình tự sản phẩm PCR gen <i>bla_{OXA-51-like}</i> với trình tự gen chuẩn	73
Hình 3.7. Kết quả đại diện so sánh giải trình tự sản phẩm PCR gen <i>ISAbal/bla_{OXA-23-like}</i> với trình tự gen chuẩn	74
Hình 3.8. Hình ảnh đại diện cho kiểu gen PFGE của <i>A.baumannii</i>	78
Hình 3.9. Mối liên hệ kiểu gen của 144 chủng <i>A. baumannii</i> phân lập tại 9 bệnh viện	81
Hình 3.10. Kiểu hình đề kháng ở các cụm có kiểu gen PFGE tương đồng..	83
Hình 3.11. Ảnh kết quả đại diện thử nghiệm MHT (trái) và THT (phải)	84
Hình 3.12. Ảnh kết quả đại diện cho kỹ thuật CarbAcineto NP	84

ĐẶT VẤN ĐỀ

Những năm gần đây, *Acinetobacter baumannii* từ một vi khuẩn gây bệnh cơ hội đã trở thành một mầm bệnh “báo động đỏ” đe dọa đến sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới với khả năng gây ra các bệnh nhiễm khuẩn nặng, mức độ kháng thuốc và tỷ lệ tử vong cao [1],[2]. *A. baumannii* là một trong những tác nhân chính gây nhiễm khuẩn bệnh viện (NKBV). Đặc biệt, *A. baumannii* thường đứng thứ nhất hoặc thứ 2 trong số căn nguyên gây viêm phổi liên quan đến thở máy (Ventilator-associated pneumonia-VAP) [3].

Ngoài các yếu tố độc lực, khả năng đề kháng kháng sinh (KS) đã giúp *A. baumannii* trở thành một trong những căn nguyên gây nhiễm khuẩn khó điều trị nhất hiện nay. *A. baumannii* có thể đề kháng với tất cả các KS hiện có được sử dụng trên lâm sàng. Đặc biệt, *A. baumannii* kháng carbapenem (Carbapenem resistant *A. baumannii* – CRAB) đã gia tăng nhanh chóng trên toàn thế giới ở mức độ báo động. CRAB được Tổ chức Y tế Thế giới xếp vào nhóm vi khuẩn ưu tiên số 1 hiện nay trong việc kiểm soát và điều trị [4].

Vi khuẩn có rất nhiều cơ chế đề kháng carbapenem khác nhau [5]. Tuy nhiên, sinh carbapenemase vẫn là cơ chế đề kháng carbapenem chủ yếu và quan trọng nhất ở *A. baumannii* [6],[7]. Nhiều loại carbapenemase ở *A. baumannii* đã xuất hiện và ngày càng đa dạng hơn với rất nhiều biến thể mới. [6]. Tuy nhiên, carbapenemase lớp D và B mà đặc biệt là lớp D là loại phổ biến nhất ở *A. baumannii* trên toàn thế giới nói chung và ở Châu Á nói riêng [8],[9],[10].

Nhiều gen mã hóa carbapenemase ở *A. baumannii* nằm trên nhiễm sắc thể và/hoặc plasmid, chúng thường được kết hợp trong hoặc cùng với các yếu tố di truyền di động (mobile genetic elements), nên dễ dàng được lan truyền ngang (Horizontal transfer) sang các vi khuẩn cùng loài và khác loài [6],[11]. Việc xác định sớm các chủng vi khuẩn sinh carbapenemase để thực hiện các biện pháp kiểm soát nhiễm khuẩn và lựa chọn KS thích hợp là rất quan trọng [12]. Tuy nhiên, do tính thấm nội tại của màng ngoài ở *Acinetobacter* thấp

[13] và hoạt tính enzyme của một số loại carbapenemase ở *Acinetobacter* yếu, nên phát hiện carbapenemase ở *Acinetobacter* được cho là khó hơn so với *Enterobacteriaceae* và *Pseudomonas spp* [14],[15].

Hiện nay ở Việt Nam, *A. baumannii* không những là một trong ba căn nguyên chính gây NKBV với mức độ đề kháng carbapenem rất cao [16],[17],[18]. Đã có những nghiên cứu về một số gen đề kháng carbapenem ở *A. baumannii* qua cơ chế sinh carbapenemase [19],[20],[21],[22],[23]. Tuy nhiên, các đề tài này thường chỉ nghiên cứu trên các chủng *A. baumannii* phân lập ở một hoặc một số bệnh viện tại một vùng miền/khu vực. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Hà thực hiện trên các chủng *A. baumannii* gây nhiễm khuẩn huyết từ 7 bệnh viện ở 3 miền của Việt Nam (2011-2012) và mới chỉ nghiên cứu một số gen *bla_{OXA}* [19]. Hơn nữa, hiện chưa có nghiên cứu nào về phương pháp phát hiện sinh carbapenemase trên các chủng *A. baumannii* lưu hành ở Việt Nam để xác nhận phương pháp phù hợp cho thực hành thường qui tại các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng. Việc phát hiện sớm, chính xác các chủng vi khuẩn sinh carbapenemase để thực hiện các biện pháp kiểm soát nhiễm khuẩn và lựa chọn KS thích hợp là rất quan trọng. Vì lý do trên, chúng tôi tiến hành thực hiện nghiên cứu đề tài “*Một số gen mã hoá carbapenemase và mối liên quan với mức độ kháng carbapenem của Acinetobacter baumannii tại Việt Nam*”, với 3 mục tiêu:

1. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của carbapenem với các chủng *A. baumannii* phân lập tại Việt Nam năm 2016.
2. Phát hiện một số gen mã hoá carbapenemase lớp D và B của các chủng *A. baumannii*.
3. Tìm mối liên quan giữa MIC với sự xuất hiện carbapenemase và gen mã hóa carbapenemase.

Chương 1

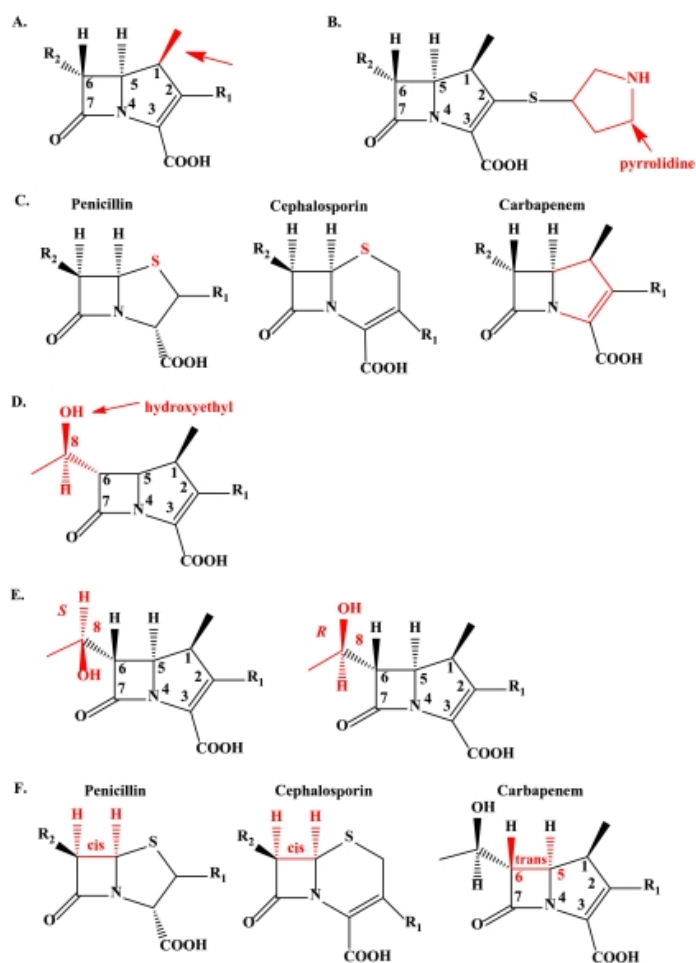
TỔNG QUAN

1.1. KHÁNG SINH NHÓM CARBAPENEM

1.1.1. Cấu trúc của kháng sinh nhóm carbapenem

Thienamycin là KS đầu tiên thuộc nhóm carbapenem và được tách chiết từ *Streptomyces cattleya* vào năm 1976.

Hiện nay, đã có hơn 80 hợp chất với hoạt tính kháng khuẩn được cải tiến so với thienamycin [24]. Năm 1985, imipenem trở thành carbapenem đầu tiên được sử dụng để điều trị trên lâm sàng. Tiếp theo, các KS như ertapenem, meropenem, doripenem, panipenem, biapenem đã được phát triển.



Hình 1.1: Cấu trúc hóa học của beta-lactam [24]

Carbapenem là các KS thuộc nhóm beta-lactam. Carbapenem có cấu trúc tương tự như penicillin nhưng có liên kết không bão hòa giữa C2, C3 và nguyên tố lưu huỳnh được thay thế bằng nguyên tố các bon ở vị trí 1, điều này làm tăng hiệu suất và phổ tác dụng của carbapenem và sự ổn định của chúng với beta-lactamase (Hình 1.1C).

Hydroxyethyl (hình 1.1D) và cấu hình *trans* của vòng β -lactam ở C5 và C6 (hình 1.1F) dẫn đến sự ổn định hơn đối với beta-lactamases so với penicillin và cephalosporin. Cấu hình R của hydroxyethyl làm tăng hoạt tính của carbapenem (Hình 1.1E).

Vòng pyrrolidin (hình 1.1B) tăng độ ổn định và phổ tác dụng của KS. Meropenem có vòng pyrrolidin nên phạm vi tác dụng rộng trên *Pseudomonas aeruginosa* và VK kỵ khí. 1- β -methyl (hình 1.1A) làm tăng khả năng kháng lại dehydropeptidase ở thận của động vật có vú (Tuy nhiên, imipenem không có 1- β -methyl).

1.1.2. Cơ chế tác động của carbapenem

Carbapenem là một loại KS ưa nước như các beta-lactam khác, chúng xâm nhập vào vi khuẩn Gram âm qua các protein màng ngoài (outer membrane protein-OMP) còn gọi là porin. Sau đó, carbapenem liên kết với các protein gắn penicilin (Penicillin-Binding Proteins-PBPs) [25].

Kháng sinh carbapenem có cấu trúc tương tự d-alanyl-d-alanine (tiền chất của gốc pentapeptid của peptidoglycan). Sự tương đồng về cấu trúc tạo điều kiện để carbapenem gắn kết với vị trí hoạt tính của PBP. Đây là liên kết bền vững dẫn đến làm mất hoạt tính của PBP - ức chế tác dụng transpeptidase của PBP, ngăn cản tạo các liên kết ngang giữa các chuỗi glycan của lớp peptidoglycan mới. Sự tích tụ tiền chất peptidoglycan làm kích hoạt hoạt động tự ly giải peptidoglycan trong khi không có peptidoglycan mới được hình thành. Kết quả là hoạt động diệt khuẩn của kháng sinh beta-lactam được tăng

cường và cuối cùng tính toàn vẹn cấu trúc của vách tế bào giảm xuống đến khi quá trình tự ly giải xảy ra. Yếu tố chính làm tăng hiệu quả của carbapenem là khả năng liên kết với nhiều loại PBP khác nhau [25].

Carbapenems có hoạt tính chống lại các vi khuẩn Gram dương (ngoại trừ *Staphylococcus aureus* kháng methicillin và *Enterococcus faecium*). Meropenem có hoạt tính mạnh hơn 10-20 lần so với vancomycin hoặc methicillin trên *Staphylococci* [26].

Carbapenem là các thuốc có hoạt tính mạnh nhất so với các KS có tác dụng trên vi khuẩn kỵ khí, doripenem thường có nồng độ ức chế tối thiểu (Minimal inhibitory concentration-MIC) $MIC_{90} \leq 1 \mu\text{g/ml}$ trong khi MIC của cefoxitin, clindamycin và metronidazole tương ứng là 32, 16 và 2 $\mu\text{g/ml}$.

1.2. ACINETOBACTER BAUMANNII

Acinetobacter được Martinus W. Beijerinck (người Hà Lan) phân lập được từ đất năm 1911 và được đặt tên là *Micrococcus calcoaceticus* [27].

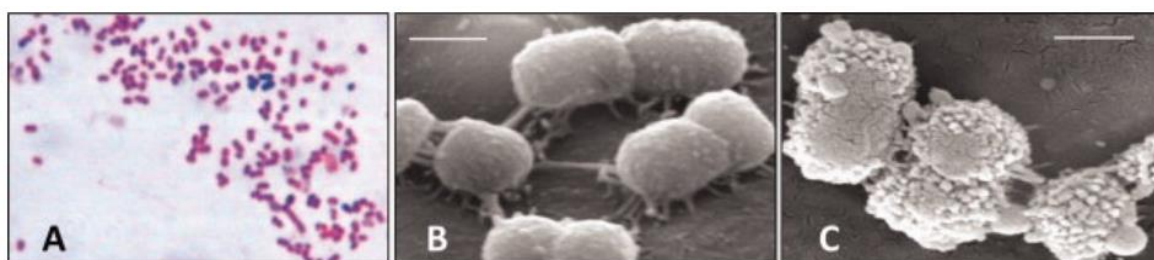
Năm 1971, Ủy ban Quốc tế về danh pháp của vi khuẩn chính thức công nhận chi *Acinetobacter* dựa trên nghiên cứu của Baumann năm 1968 [28].

Theo các nghiên cứu phân loại gần đây nhất, chi *Acinetobacter* thuộc phân lớp *Gammaproteobacteria*, bộ *Pseudomonadales*, họ *Moraxellaceae* (Gồm các chi *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*).

Hiện nay, chi *Acinetobacter* bao gồm 63 loài đã được đặt tên và 11 loài khác chưa được công bố chính thức, ngoài ra còn có 17 loài đang nghiên cứu. (<http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>) (Truy cập tháng 4/2020).

1.2.1. Đặc điểm sinh học của *A. baumannii*

A. baumannii là vi khuẩn Gram âm, có hình thái cầu trực khuẩn, kích thước khoảng 1,0 - 1,5 x 2,0 - 2,5 μm , thường đứng thành đôi hoặc đám (Hình 1.2).



Hình 1.2: Hình thái và tính chất nhuộm Gram của *A. baumannii* [29]

Chú thích: (A). Hình ảnh *A. baumannii* trên tiêu bản nhuộm Gram.

(B) và (C): Hình ảnh *A. baumannii* dưới kính hiển vi điện tử

A. baumannii không lên men đường, hiếu khí tuyệt đối, dễ mọc trên các môi trường nuôi cấy thông thường. Chúng có thể phát triển được ở nhiệt độ từ 15 - 44°C, nhiệt độ tối ưu là 33 - 35°C. *A. baumannii* là vi khuẩn duy nhất trong chi *Acinetobacter* có thể phát triển ở nhiệt độ 44°C [30].

Khuẩn lạc của *A. baumannii* trên môi trường tryptocasein có hình tròn, lồi, trơn, hơi nhầy, màu xám đục hoặc vàng nhạt. Đường kính khuẩn lạc từ 2 - 3 mm sau 18-24 giờ nuôi cấy. Đôi khi, vi khuẩn gây tan huyết ở môi trường thạch máu cừu, ngựa [31].

Các tính chất sinh hóa khác [32]: Vi khuẩn sinh catalase; có thể sinh acid yếu từ glucose, lactose, manose, galactose; thử nghiệm Citrat Simmon (dương tính); Red methyl và Voges-Proskauer (Âm tính), không có khả năng sinh oxidase, indole, không di động.

Acinetobacter là thành viên duy nhất của họ *Moraxellaceae* không có cytochrome oxidase. Đây là tính chất thường được các nhà vi sinh lâm sàng sử dụng để phân biệt *Acinetobacter* với các *Moraxellaceae* khác.

1.2.2. Các yếu tố độc lực của *A. baumannii*

1.2.2.1. Protein màng ngoài (Outer membrane protein - Omp)

Một số Omp ở *A. baumannii* như OmpA, Omp từ 33 đến 36 kDa (Omp33-36), Omp22, ngoài vai trò sinh học là một porin cho các chất hòa tan nhỏ thấm qua chúng còn đóng một vai trò trong sinh bệnh học của *A. baumannii*.

Các Omp chịu trách nhiệm về sự tương tác của *A. baumannii* với tế bào biểu mô vật chủ. Vi khuẩn đột biến mất AbOmpA giảm 95% sự xâm nhập vào tế bào vật chủ so với chủng vi khuẩn hoang dại (wild typ). Đặc biệt là khả năng gắn kết của AbOmpA với tế bào biểu mô đường hô hấp cao hơn so với các tế bào biểu mô khác. Đây có thể là một yếu tố góp phần cho sự phổ biến của nhiễm khuẩn do *A. baumannii* tại đường hô hấp [33]. Các chủng đột biến mất AbOmpA rất nhạy cảm với huyết thanh người so với chủng *A. baumannii* hoang dại [34] và hiếm khi được phát hiện trong máu [33].

Hơn nữa, OmpA cũng đóng góp vào kiểu hình đề kháng KS ở *A. baumannii*. Các chủng mất gen OmpA nhạy cảm hơn so với chủng có biểu hiện OmpA đối với chloramphenicol (>8 lần), aztreonam (8 lần), và acid nalidixic (3 lần) [35].

1.2.2.2. Một số yếu tố ở vỏ của *A. baumannii*

Lipopolysaccharide (LPS)

LPS là thành phần chính của lớp ngoài cùng của màng ngoài ở hầu hết các vi khuẩn Gram âm, là một yếu tố kích thích đáp ứng miễn dịch, giải phóng các yếu tố hoại tử khối u và interleukin 8 từ các đại thực bào. LPS đóng một vai trò quan trọng đối với độc lực và sự tồn tại của *A. baumannii* trong vật chủ [36]. Ngăn chặn tổng hợp LPS là một chiến lược để khám phá các kháng sinh mới.

Polysaccharides vỏ

Các đột biến gen không sản xuất polysaccharide làm giảm tính gây chết trong mô hình nhiễm khuẩn huyết ở chuột [37]. Ngoài ra, polysaccharide vỏ còn liên quan đến tính đề kháng KS của *A. baumannii*. Các đột biến thiếu polysaccharide vỏ dẫn đến vi khuẩn đề kháng thấp hơn đối với KS peptide [38].

1.2.2.3. Hệ thống thu nhận kim loại

A. baumannii có khả năng thu nhận các ion sắt trong các điều kiện hạn chế sắt do có các chất có ái lực cao với sắt như siderophore và acinetobactin. Trong điều kiện nồng độ sắt thấp, mức phiên mã của các gen quy định các yếu tố thu nhận sắt đã tăng lên gấp 2 lần đối với 463 gen và gấp 4 lần đối với 95 gen, đặc biệt đối với 3 cụm gen sinh tổng hợp siderophore [39].

1.2.2.4. Phospholipase

Phospholipase là một enzyme cần thiết cho quá trình trao đổi phospholipid và là một yếu tố độc lực trong nhiều loại vi khuẩn. Giảm tổng hợp phospholipase ở *A. baumannii* làm giảm khả năng đề kháng với huyết thanh người, giảm khả năng xâm nhập các tế bào biểu mô và giảm độc lực trong mô hình gây bệnh ở phổi [40].

1.2.2.5. Khả năng tạo màng sinh học (Biofilm)

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh khả năng tạo màng sinh học mạnh mẽ của *A. baumannii* trên cả bề mặt sinh học và không sinh học [41],[42]. Màng sinh học giúp *A. baumannii* có thể tồn tại trên các đồ vật như thủy tinh, nhựa và các bề mặt môi trường khác ngay cả trong điều kiện khô trong một thời gian dài. Vi khuẩn trong màng sinh học có thời gian sống dài hơn (36 ngày so với 15 ngày, với $p < 0,001$) [43] và có khả năng đề kháng KS cao gấp 1000 lần so với các vi khuẩn không tạo màng sinh học [44]. Như vậy, việc hình thành màng sinh học góp phần vào sự tồn tại của *A. baumannii* trong điều kiện môi trường bất lợi như môi trường bệnh viện và trên các thiết bị y tế.

Như vậy, khả năng gây bệnh của *A. baumannii* có thể do một số yếu tố tạo nên độc lực của vi khuẩn này: (i) khả năng hình thành màng sinh học; (ii) khả năng bám dính, xâm nhập vào các tế bào biểu mô của con người; (iii) khả năng trốn tránh hệ miễn dịch; (iv) và có nhiều cơ chế đề kháng KS [1].

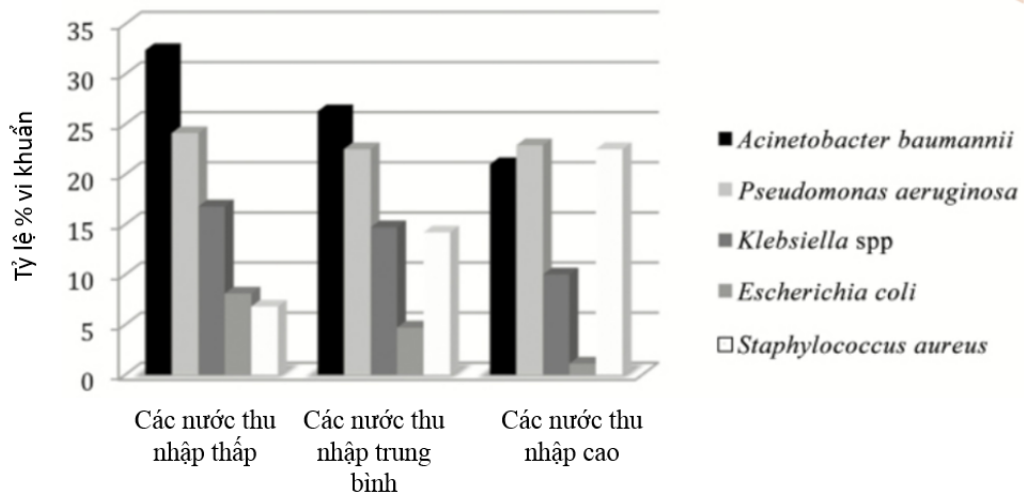
1.2.3. Khả năng gây bệnh của *A. baumannii*

Trong chi *Acinetobacter*, *A. baumannii* là loài gây bệnh phổ biến nhất trên toàn thế giới [45],[46]. Trước đây, *A. baumannii* được coi là một loại vi khuẩn gây bệnh cơ hội có độc lực thấp. Tuy nhiên, những năm gần đây, đã có sự gia tăng nhanh chóng tỷ lệ nhiễm khuẩn do *A. baumannii* trên toàn thế giới. Đặc biệt, *A. baumannii* là một trong những tác nhân chính gây nhiễm khuẩn bệnh viện và đã trở thành mầm bệnh “báo động đỏ” ở người [1].

Nhiễm trùng do *A. baumannii* ngày càng trở nên phổ biến ở những bệnh nhân nặng điều trị tại các đơn vị chăm sóc tích cực (intensive care unit - ICU). Điều này, một phần liên quan đến các quy trình chẩn đoán, điều trị xâm lấn được sử dụng ngày càng nhiều ở ICU. Với rất nhiều các yếu tố độc lực giúp *A. baumannii* tồn tại lâu và trở thành một tác nhân thường trú trong môi trường bệnh viện, có khả năng phát tán và lây lan gây các đợt nhiễm khuẩn bùng phát.

A. baumannii có thể gây ra nhiều loại bệnh nhiễm trùng cấp tính liên quan đến NKBV như: Nhiễm trùng đường hô hấp, nhiễm khuẩn huyết, nhiễm trùng đường tiết niệu, nhiễm trùng da và mô mềm, viêm nội tâm mạc, viêm màng não và viêm tủy xương... [47]. Các yếu tố nguy cơ khiến bệnh nhân dễ bị nhiễm khuẩn và nhiễm *A. baumannii* bao gồm: Mắc bệnh mạn tính, phẫu thuật, thủ thuật, chấn thương lớn, sinh non hoặc cao tuổi, nhập viện, điều trị kháng sinh cũng như các can thiệp điều trị y tế bao gồm thở máy, ống thông nội mạch, ống thông tiêu và dẫn lưu...

Trong số các NKBV do *A. baumannii*, nhiễm khuẩn đường hô hấp đặc biệt là VAP chiếm tỷ lệ cao nhất. Ở các nước phát triển, *A. baumannii* thường đứng thứ 2 (khoảng 14%) sau *P. aeruginosa* gây VAP [48]. Trong khi đó, ở các nước thu nhập thấp và trung bình, *A. baumannii* thường đứng đầu (26 - >50%) trong số căn nguyên gây VAP (Biểu đồ 1.1) [3],[49].



Biểu đồ 1.1. Phân bố căn nguyên gây VAP theo mức thu nhập của các nước [3]

Ngoài tỷ lệ gây bệnh thường gặp hơn các loài *Acinetobacter* khác, *A. baumannii* thường gây bệnh với mức độ nặng hơn và tỷ lệ tử vong cao hơn [46],[50]. Theo kết quả nghiên cứu của Lee và cộng sự, khi so sánh tỷ lệ tử vong giữa 2 nhóm VAP do *A. baumannii* và *A. nosocomialis*, kết quả: tỷ lệ tử vong ở nhóm bệnh nhân VAP do *A. baumannii* là 34,7% so với VAP do *A. nosocomialis* là 15,3% (với $p < 0,001$); *A. baumannii* là một yếu tố nguy cơ độc lập gây tử vong (OR = 2,03; KTC 95%, 1,05 – 3,90; $p = 0,035$) trong nhóm nghiên cứu thuần tập sau khi điều chỉnh các yếu tố nguy cơ tử vong khác, bao gồm liệu pháp kháng sinh không phù hợp [50].

A. baumannii cũng là một nguyên nhân phổ biến gây nhiễm trùng huyết trên bệnh nhân điều trị tại ICU. Các nguồn phổ biến nhất của nhiễm trùng huyết do *A. baumannii* là nhiễm trùng đường hô hấp dưới và nhiễm trùng catheter, nhiễm trùng đường tiểu. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, tỷ lệ nhiễm *A. baumannii* cao trong các đơn vị bỏng đã nhấn mạnh tầm quan trọng của *A. baumannii* trong quần thể bệnh nhân này.

Ngoài khả năng gây ra các nhiễm trùng liên quan đến NKBV, đã có nhiều báo cáo về nhiễm khuẩn ở cộng đồng do *A. baumannii* đặc biệt là viêm

phổi cộng đồng (community-acquired pneumonia-CAP) [51],[52]. Mặc dù tỷ lệ CAP do *A. baumannii* không cao nhưng nó là nguyên nhân hàng đầu gây CAP nặng và có tỷ lệ tử vong cao. Trong một tổng hợp các nghiên cứu liên quan đến nhiễm *A. baumannii* mắc phải trong cộng đồng cho thấy, trong 80 bệnh nhân có 51 người bị viêm phổi, 29 người bị nhiễm khuẩn huyết và 45 người (56%) trong số họ đã tử vong do nhiễm trùng [51]. Tương tự, theo kết quả nghiên cứu trên 13 bệnh nhân được chẩn đoán CAP do *A. baumannii*, mặc dù tất cả các chủng *A. baumannii* phân lập được đều nhạy cảm với imipenem nhưng tỷ lệ tử vong vẫn rất cao (62%) [52]. Những bệnh nhân này thường mắc bệnh nặng như bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính, tiểu đường, suy giảm miễn dịch hoặc hút thuốc lá nặng. Ngoài ra, *A. baumannii* được coi là tác nhân chính gây CAP liên quan đến lạm dụng rượu dẫn đến tỷ lệ tử vong cao > 50% [51].

Ngoài ra, nhiễm trùng do *A. baumannii* ở những người sống sót sau thảm họa thiên nhiên và vết thương chiến tranh cũng đã được xác định. Trong một nghiên cứu, *A. baumannii* chiếm 63% các chủng vi khuẩn được phân lập từ vết thương ở quân nhân Hoa Kỳ trong cuộc chiến tranh giữa Iraq và Afghanistan (từ năm 2007-2008) [53].

1.2.4. Đặc điểm bộ gen liên quan đến độc lực, khả năng gây bệnh và sức đề kháng của *A. baumannii*

Trong chi *Acinetobacter*, một số loài như *A. baumannii*, *A. pittii* và *A. nosocomialis* có khả năng gây bệnh và phát triển khả năng đề kháng KS hơn các loài khác. Đã có những nghiên cứu về gen, kiểu hình và các yếu tố độc lực để xác định sự khác biệt giữa các loài *Acinetobacter*.

Phân tích gen của 40 chủng đại diện cho 9 loài *Acinetobacter* cho thấy, bộ gen lõi (core genome) của *A. baumannii* chứa nhiều gen quan trọng đối với quá trình trao đổi chất và sự tồn tại của vi khuẩn trong vật chủ. Hầu hết các

gen thuộc core genome của *A. baumannii* cũng có mặt ở một số loài ít gây bệnh hơn trên lâm sàng. Tuy nhiên, khi so sánh những gen phụ của các chủng *A. baumannii* với chủng *Acinetobacter spp.* khác cho thấy có nhiều vùng gen giả định quy định các yếu tố độc lực chỉ có ở *A. baumannii*, như: các operon kiểm soát tổng hợp acinetobactin, siderophore, sinh tổng hợp LPS, pili, có thể sử dụng nguồn nitơ hiệu quả hơn và có khả năng chịu pH, áp suất thẩm thấu và kháng khuẩn cao hơn [54].

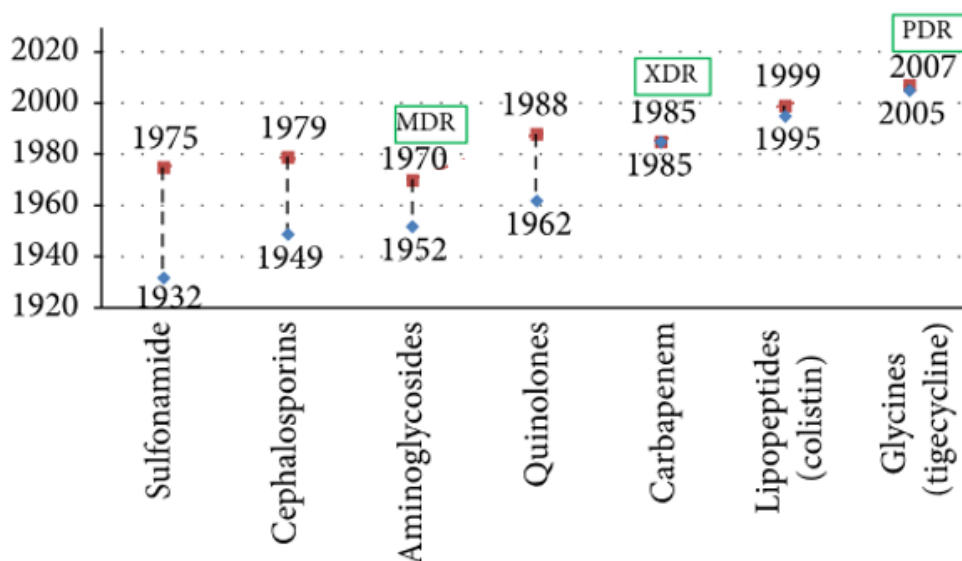
Các phân tích di truyền cho thấy, bộ gen của *A. baumannii* có tính đa dạng cao, với rất nhiều ADN ngoại lai. Điều này chứng tỏ việc chuyển gen ngang giữa các loài vi khuẩn xảy ra thường xuyên đối với vi khuẩn này. *A. baumannii* dễ dàng thu nhận các yếu tố di truyền mới, đây có thể là tính năng quan trọng trong sự tiến hóa của VK này đối với khả năng gây bệnh [55].

1.2.5. Tình hình kháng kháng sinh của *A. baumannii*

Giai đoạn đầu những năm 1960 - 1970, các NKBV do *Acinetobacter* đã được kiểm soát dễ dàng với kháng sinh β -lactam và sulfonamides. Tuy nhiên, các phương pháp điều trị này nhanh chóng trở nên không hiệu quả sau đó.

Những năm 1980, các báo cáo về NKBV do nhiễm *A. baumannii* đã tăng lên đáng kể và đặc biệt tập trung vào khả năng đề kháng KS. Nói chung, tần suất xuất hiện *A. baumannii* trong các chủng phân lập lâm sàng tăng tương quan với sự gia tăng khả năng đề kháng KS.

Năm 1985, imipenem được đưa vào sử dụng trên lâm sàng để điều trị nhiễm trùng do vi khuẩn MDR. Sự đề kháng với KS này đã được báo cáo trong cùng năm đó từ một chủng *A. baumannii* kháng imipenem phân lập được trên một bệnh nhân ở Edinburgh, Scotland năm 1985.



Hình 1.3. Thời gian KS được đưa vào sử dụng trên lâm sàng (◆) và thời điểm xuất hiện *Acinetobacter* đề kháng KS (■) [6]

Ghi chú: MDR (multidrug resistant- Đa kháng), XDR (extensively drug resistant- Kháng mở rộng), PDR (pandrug resistant-Toàn kháng).

Tuy nhiên, những năm đầu của thập niên 90, imipenem vẫn là KS có hiệu quả nhất chống lại *A. baumannii*. Trong khi, piperacilline, ceftazidime, ceftriazone đã giảm tác dụng với *A. baumannii* ở các mức độ khác nhau. Trong số 268 chủng *A. baumannii* phân lập tại bệnh viện ở Pháp năm 1991, 100% chủng nhạy cảm với imipenem, 71% với ceftazidime, nhưng chỉ 21% còn nhạy với piperacillin, cefotaxime và aztreonam.

Nhưng chỉ ít năm sau đó, với các chủng *Acinetobacter spp.* được thu thập từ 1994-1995 trên bệnh nhân ở ICU của 5 nước thuộc châu Âu cho thấy, đã có sự giảm tính nhạy cảm với imipenem: 88% ở Bỉ, 91% ở Pháp, 95% ở Bồ Đào Nha, 84% ở Tây Ban Nha và 81% ở Thụy Điển [56].

Hiện nay, tỷ lệ *A. baumannii* kháng imipenem là 73,9% ở các nước thuộc Tổ chức hợp tác và phát triển kinh tế (OECD) và 77,8% ở các nước không thuộc OECD [57]. Đặc biệt, theo báo cáo của một số bệnh viện tại một số nước, tỷ lệ CRAB lên đến gần 100% [58],[59].

Hiện tại, *A. baumannii* đã có thể đề kháng với hầu hết các KS hiện có được sử dụng trên lâm sàng kể cả colistin - là phương thức cuối cùng để điều trị *A. baumannii* đa kháng [60],[61],[62].

Kể từ khi *Acinetobacter spp.* kháng colistin được báo cáo lần đầu tiên tại Cộng hòa Séc vào năm 1999 [61], số lượng các báo cáo về kháng colistin ở *Acinetobacter* trên toàn thế giới đã tăng lên hàng năm. Tuy nhiên, tỷ lệ *A. baumannii* kháng colistin khá khác nhau theo các báo cáo (< 7% ở một số nước châu Âu [62] và 40,7% ở một bệnh viện ở Tây Ban Nha [63]).

1.2.6. Cơ sở di truyền học của sự lan truyền gen đề kháng kháng sinh ở *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii được đặc trưng bởi khả năng đề kháng tự nhiên đối với nhiều loại KS (ví dụ: Amoxicillin, cephalosporin phổ hẹp, ertapenem, chloramphenicol, trimethoprim, glycopeptide, macrolides, lincosamides, streptogramin). Hơn nữa, loại vi khuẩn này có thể dễ dàng phát triển tính đề kháng với tất cả các KS được sử dụng trong điều trị do đột biến và khả năng thu nhận, tích lũy, phổ biến nhiều cơ chế đề kháng KS thu được khác nhau qua lan truyền gen ngang giữa các tế bào vi khuẩn cùng hoặc khác loài. Do đó, *A. baumannii* sở hữu nhiều cơ chế đề kháng KS khác nhau, như sinh enzyme thủy phân hoặc biến đổi KS, thay đổi protein gắn KS, giảm tính thấm của màng, tăng hoạt động của bơm đẩy KS ra ngoài [7].

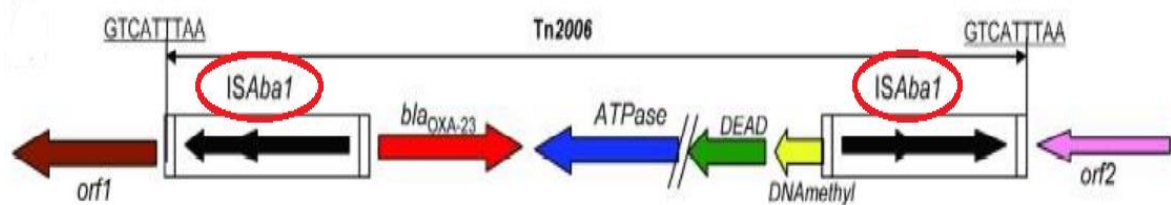
Các yếu tố quyết định đề kháng KS ở *A. baumannii* nằm trên nhiễm sắc thể và hoặc plasmid. Chúng thường được kết hợp trong/cùng với các thành phần di truyền di động, như: các trình tự chèn (Insertion sequence-IS), transposons, integron và cụm gen kháng (Resistance island-RI) nên dễ dàng được lan truyền ngang sang các vi khuẩn cùng loài và khác loài [6]. Sự lan truyền gen ngang của các gen đề kháng KS có vai trò quan trọng đối với sự xuất hiện, tái tổ hợp và phổ biến các yếu tố quyết định kháng KS trong các tác nhân gây bệnh vi khuẩn nói chung và *A. baumannii* nói riêng [11].

1.2.6.1. Trình tự chèn (*insertion sequences-IS*) và *transposon* ở *A. baumannii*

Transposon là những đoạn ADN chứa một hoặc nhiều gen, có hai đầu tận cùng là những đoạn lặp đảo ngược (*inverted repeats-IR*), có thể chuyển vị trí (*transposition*) từ phân tử ADN này sang phân tử ADN khác.

IS là yếu tố di truyền di động, thường có kích thước từ 0,5 - 2 kb, mang 1 hoặc 2 gen mã hóa enzyme *transposase* (*tnp*) và có 2 IR ở 2 đầu là điểm gắn của *transposase*.

Transposon và IS gây đột biến chèn, sắp xếp lại bộ gen và có vai trò quan trọng trong sự lan truyền của các gen đề kháng KS và gen độc lực trong các loài vi khuẩn. Trong nhiều trường hợp, một cặp IS có thể di chuyển cùng nhau kèm theo một hoặc vài gen (ví dụ gen kháng KS) nằm ở giữa sẽ tạo thành một *transposon* hỗn hợp (*composit transposon* - ký hiệu là *Tn*) (Hình 1.4). *Transposon* hỗn hợp có thể huy động nhiều loại gen kháng, góp phần phổ biến khả năng đề kháng KS ở vi khuẩn [64].



Hình 1.4. Tn 2006 với ISAbal ở trước và sau của gen *bla*_{OXA-23} ở *A. baumannii* [8]

Các *transposons* Tn2006, Tn2007 và Tn2008 là cấu trúc di truyền chứa gen *bla*_{OXA-23} một gen mã hóa carbapenemase thường gặp nhất ở *A. baumannii*. Tn2006 ở *A. baumannii* với 2 ISAbal nằm ở hai phía của gen *bla*_{OXA-23} (Hình 1.4) [8].

Bên cạnh vai trò chuyển vị trí, một số IS đã được chứng minh là kích hoạt hoặc làm tăng sự biểu hiện của các gen lân cận. Khả năng này có thể là do sự có mặt của các vùng promoter trong trình tự chèn hoặc bởi sự hình thành các promoter mới sau sự kiện chèn [64].

ISAbal thường được tìm thấy ngay vùng trước (uptrean) của gen *bla*_{AmpC} và *bla*_{OXA-23-like} và *bla*_{OXA-51-like} ở *A. baumannii* và có vai trò trong việc làm tăng khả năng đề kháng ceftazidime và carbapenem tương ứng. Kết quả của nhiều nghiên cứu cho thấy, các chủng có *ISAbal* được tìm thấy ở vùng trước của gen *bla*_{OXA-23-like} và *bla*_{OXA-51-like} đều có tính kháng carbapenems, trong khi những chủng không có *ISAbal* gần các gen này thì nhạy cảm với carbapenems [65],[66].

1.2.6.2. Gen cassette (cụm gen) và integron ở *A. baumannii*

Gen cassette là yếu tố di truyền di động nhỏ nhất, có kích thước từ 500–1000 bp, vừa đủ để mang một gen thường là gen kháng KS. Gen cassette thường chèn vào các integron và có thể tạo thành mảng băng gen (gen cassette array).

Như vậy, integron là hệ thống thu nhận gen linh hoạt, tạo ra sự đa dạng về kiểu hình và hình thành các điều kiện cho phép vi khuẩn thích nghi, phát triển và đặc biệt là phát triển tính đa kháng KS thông qua việc thu nhận, lưu giữ, biểu hiện và trao đổi các gen array [67].

Nhiều loại intergron đã được xác định ở *A. baumannii* và có vai trò quan trọng trong phát triển tính đa đề kháng KS ở *A. baumannii* [11],[68].

1.2.6.3. Cụm gen kháng (Resistance island-RI) ở *A. baumannii*

Nhiều gen quy định tính đề kháng KS được hợp lại trong cùng một vị trí di truyền gọi là RI. RI là cụm gen di truyền trên NST có nguồn gốc từ chuyển gen ngang, RI có thể được chuyển toàn bộ từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác.

Fournier và CS, đã mô tả *AbaR* là RI được báo cáo lần đầu tiên ở *A. baumannii*. Đã xác định được 52 gen liên quan đến tính đề kháng KS trong chủng *A. baumannii*, 45 gen (chiếm 86,5%) trong số đó nằm trong *AbaR1* (86 kb). Trong số 45 gen kháng được mô tả ở *AbaR1*, 25 gen có liên quan đến tính đề

kháng với một số loại KS, như aminoglycosides, tetracycline, cotrimoxazole và chloramphenicol [69].

Một số *AbaR* đã được mô tả ở *A. baumannii* như *AbaR1*, *AbaR3*, *AbaR5*, *AbaR6*, *AbaR7*, *AbaR8*, *AbaR9* và *AbaR10*. Các cụm gen kháng này đã được mô tả trong các chủng vi khuẩn *A. baumannii* thuộc các dòng vô tính quan trọng trên toàn cầu, clone Châu Âu I (European Clone I - EC I) và EC II được biết đến với khả năng gia tăng lan rộng trên toàn thế giới [70].

1.3. ĐỀ KHÁNG CARBAPENEM DO CARBAPENEMASE Ở *ACINETOBACTER BAUMANNII*

1.3.1. Phân loại và cơ chế hoạt động của carbapenemase

1.3.1.1. Phân loại carbapenemase

Dựa theo cấu trúc phân tử, beta-lactamase được chia thành 4 lớp (class): A, B, C, D. Carbapenemase thuộc lớp A, B, D của beta-lactamase [71].

Dựa vào cơ chế hoạt động của enzyme, beta-lactamase được chia thành 2 loại: Beta-lactamase phụ thuộc serin (ser- β -lactamase, có serin ở vị trí hoạt động, gồm các beta-lactamase lớp A, C, D) và beta-lactamase phụ thuộc kẽm (Có chứa Zn^{++} ở vị trí hoạt động) là các beta-lactamase lớp B (Metallo-beta-lactamase - MBL) [72].

Dựa vào chức năng (khả năng thủy phân các nhóm KS và các chất ức chế beta-lactamase như: axit clavulanic, sulbactam và tazobactam), beta-lactamase được chia thành 3 nhóm từ 1-3, trong đó có các dưới nhóm. Carbapenemase thuộc nhóm 2df, 2f, 3a, 3b của beta-lactamase [71].

Bảng 1.1. Phân loại beta-lactamase theo chức năng tương quan với cấu trúc phân tử [71]

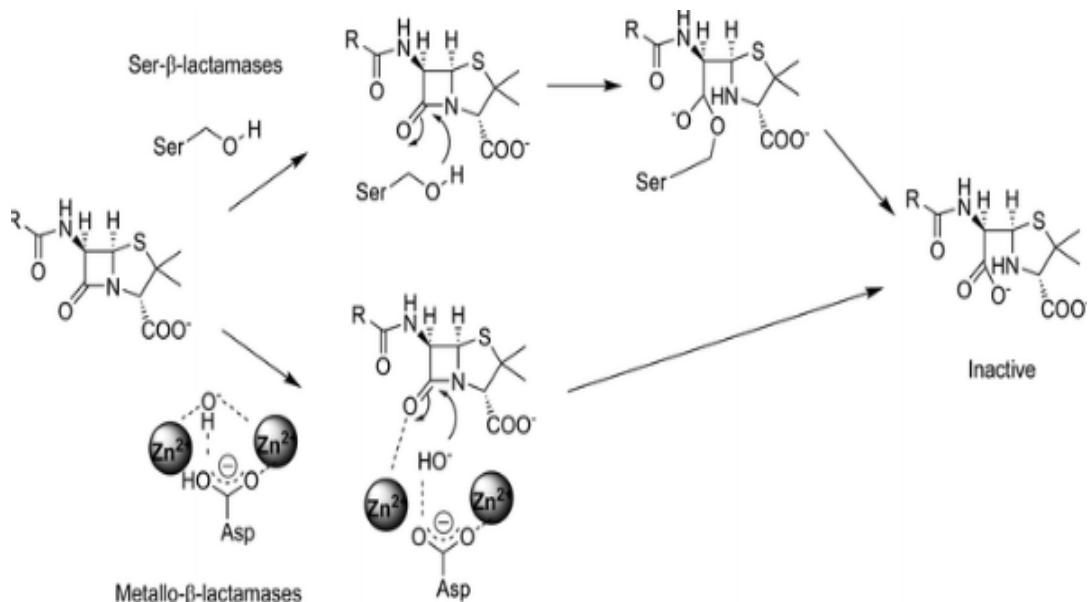
Nhóm chức năng	Lớp phân tử	KS bị thủy phân ưu tiên	Bị ức chế bởi		Enzym tiêu biểu
			Acid clavulanic	EDTA	
1	C	Cephalosporin	-	-	AmpC, P99, ACT-1, CXY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cephalosporin (Tăng thủy phân ceftazidime)	-	-	GC1, CMY-37
2a	A	Penicillin	+	-	Penicillinase từ VK Gram (+)
2b	A	Penicillin, cephalosporin phổ hẹp	+	-	TEM-1,2; SHV-1
2be	A	Penicillin, cephalosporin phổ hẹp và mở rộng, monobactam	+	-	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicillin	-	-	TEM-30, SHV-10
2ber	A	cephalosporin phổ rộng, monobactam	+	-	TEM-50
2c	A	Carbenicillin	+	-	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicillin, Cefepime	+	-	RTG-4
2d	D	Cloxacillin	±	-	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cephalosporin phổ rộng	±	-	OXA-11, OXA-15
2 df	D	Carbapenem	±	-	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cephalosporin phổ rộng	+	-	CepA
2f	A	Carbapenem	+	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B1 B2	Carbapenem (Trừ monobactam)	-	+	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	B3	Carbapenem	-	+	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1, CphA, Sth-1

“*”: EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

1.3.1.2. Cơ chế hoạt động của carbapenemase

Các beta-lactamase xúc tác sự thủy phân liên kết amit của vòng beta-lactam để tạo ra sản phẩm KS không hiệu quả (hình 1.5).

Vị trí hoạt động của MBLs rộng và linh hoạt phù hợp với hầu hết các cơ chất là beta-lactam, tạo điều kiện cho chúng có phổ hoạt động rộng. Hơn nữa, vị trí hoạt động của MBL không thấm nước nên cản trở hoạt động của các chất ức chế beta-lactamase nhóm serine, như: axit clavulanic, sulbactam và tazobactam [73].



Hình 1.5. Cơ chế tác động của beta-lactamase [74]

1.3.2. Một số loại carbapenemase lớp B và D thường gặp ở *A. baumannii*

Sinh enzyme carbapenemase là cơ chế đề kháng carbapenem thường gặp và quan trọng nhất ở *A. baumannii* [7].

Nhiều loại carbapenemase đã được xác định ở *A. baumannii* [6],[7]. Tuy nhiên, carbapenemase lớp B và D mà đặc biệt là carbapenemase lớp D là loại thường gặp nhất ở *A. baumannii*. Mặc dù, hoạt tính thủy phân của carbapenemase lớp D yếu nhưng kháng carbapenem ở *A. baumannii* chủ yếu vẫn do các enzyme nhóm này [8],[9].

Bảng 1.2. Một số loại carbapenemase lớp D, B thường gặp ở *A. baumannii* [6],[9],[10]

TT	Lớp carbapenemase	Loại carbapenemase thường gặp
1	Class D	OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-58-like, OXA-24/40-like, OXA-143-like, OXA-235-like
2	Class B	NDM-like, IMP-like, VIM-like, SIM-like

1.3.2.1. Một số loại carbapenemase lớp D ở *A. baumannii*

Các carbapenemase lớp D đầu tiên được gọi là OXA (Oxacillinase) do các enzyme này thủy phân isoxazolympenicillin oxacilline nhanh hơn penicillin. Đến nay, có 191 các beta-lactamase lớp D có khả năng thủy phân các KS carbapenem được gọi là CHDLs (carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases) [9]. Dựa vào trình tự acid amin, carbapenemase nhóm D được chia thành 12 phân nhóm.

Sáu phân nhóm chính của CHDLs (OXA-51-like, OXA-23-like, OXA-58-like, OXA-24/40-like, OXA-143-like, OXA-235-like) đã được mô tả ở *A. baumannii* [6],[9]. Các *bla*_{OXA} này (ngoại trừ *bla*_{OXA-51-like}) đều có hàm lượng C+G thấp hơn mức trung bình của bộ gen lõi ở *A. baumannii* (39,2%) [75], cho thấy các gen này không có nguồn gốc từ loài này mà là các gen được thu nhận.

Đặc điểm dịch tễ và cấu trúc di truyền của các CHDL thường gặp

*** Gen *bla*_{OXA-51-like}**

OXA-51-like là phân nhóm lớn nhất của nhóm OXA, hiện đã xác định được 95 biến thể của phân nhóm này [9].

*bla*_{OXA-51-like} là gen nội tại tự nhiên của *A. baumannii*, nằm trên nhiễm sắc thể của tất cả các chủng *A. baumannii*. Gen *bla*_{OXA-51-like} đã hiện diện ở các chủng *A. baumannii* được phân lập từ nhiều quốc gia khác nhau ở cả bốn Châu lục (Pháp, Hy Lạp, Thổ Nhĩ Kỳ, Tây Ban Nha, Vương quốc Anh, Nam Phi, Hồng

Kông, Singapore và Argentina) trên Ngân hàng gen (Genbank) [76]. Theo kết quả của một số nghiên cứu cho thấy, gen *bla*_{OXA-51-like} chỉ được phát hiện ở các chủng *A. baumannii* (được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA) mà không có ở các loài *Acinetobacter* khác. Như vậy, có thể sử dụng gen *bla*_{OXA-51-like} là dấu ấn (marker) di truyền để xác định *A. baumannii* [77],[78]. Trong khi đó, xác định về mức độ loài ở *Acinetobacter* bằng phương pháp kiểu hình hiện nay như (hệ thống định danh tự động thương mại (VITEK 2, Phoenix, MicroScan WalkAway) hay bộ định danh Api 20NE (BioMerieux, Pháp) chưa được hoàn toàn chính xác, đặc biệt đối với các loài thuộc phức hợp *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* complex [78],[79].

*** Gen *bla*_{OXA-23-like}**

Gen *bla*_{OXA-23} là CHDL đầu tiên được báo cáo từ một chủng *A. baumannii* năm 1985 [80]. Đến nay, đã phát hiện 19 biến thể của OXA-23-like và thường thấy trên plasmid của các loài *Acinetobacter* [9].

Trong số các CHDL thu được ở *A. baumannii*, OXA-23-like là loại carbapenemase thường gặp nhất ở các chủng CRAB, được xác định ở tất cả các lục địa trên toàn thế giới [8],[10]. Hiện nay, tỷ lệ gen *bla*_{OXA-23-like} thường luôn cao nhất và cao hơn nhiều so với các CHDL khác [81], một số nghiên cứu còn cho thấy tỷ lệ *bla*_{OXA-23-like} là 100% ở các chủng CRAB [82].

***Gen *bla*_{OXA-58-like}**

Gen *bla*_{OXA-58-like} lần đầu tiên được báo cáo ở chủng *A. baumannii* tại một bệnh viện ở Pháp năm 2003 [83]. Hiện nay, *bla*_{OXA-58-like} được phân bố trên toàn cầu [84]. Tuy nhiên, *bla*_{OXA-58-like} không phổ biến như *bla*_{OXA-23-like}, ở châu Âu tỷ lệ *bla*_{OXA-58-like} cao hơn ở các châu lục khác [85].

*** Gen *bla*_{OXA-24/40-like}**

Gen *bla*_{OXA-24/40-like} đầu tiên được xác định ở các chủng *A. baumannii* phân lập được từ một vụ dịch tại một bệnh viện ở Tây Ban Nha năm

1997 [86]. Hiện nay, gen *bla*_{OXA-24/40-like} được báo cáo chủ yếu ở Tây Ban Nha do sự lây lan của dòng vô tính (clone). Tuy nhiên, đã có báo cáo về các trường hợp *A. baumannii* mang *bla*_{OXA-24/40} ở một số nước châu Âu [87].

*** Gen *bla*_{OXA-143-like}**

Gen *bla*_{OXA-143} được xác định đầu tiên từ một chủng *A. baumannii* kháng carbapenem được phân lập ở Braxin (2004) [88]. Một số nghiên cứu trên các chủng *A. baumannii* phân lập trên bệnh nhân ở các bệnh Braxin, tỷ lệ mang gen *bla*_{OXA-143-like} là 58,3-76% trong khi chỉ có 18% số chủng mang gen *bla*_{OXA-23-like} [89],

*** Gen *bla*_{OXA-235-like}**

Một nghiên cứu về CRAB phân lập tại Mỹ và Mexico năm 2005-2008, phát hiện *bla*_{OXA-235} và các biến thể của nó là *bla*_{OXA-236} và *bla*_{OXA-237} [90]. Gen *bla*_{OXA-235-like} nằm trên nhiễm sắc thể hoặc plasmid hoặc trên cả nhiễm sắc thể và plasmid. Theo nghiên cứu của Higgins, tất cả các chủng *A. baumannii* với *bla*_{OXA-235-like} dương tính đều có sự hiện diện của *ISAbal* [90].

Bảng 1.3. Khả năng thủy phân KS của một số loại OXA ở *A. baumannii*

Loại OXA	Khả năng thủy phân KS						Tham khảo
	Penicillin	Oxacillin	CEP phổ hẹp	CEP Phổ rộng	IPM	MEM	
OXA-51	+ (y)	+ (y)	+	-	+ (y)	-	[91]
OXA-23	+	+	+	-	+	+	[92]
OXA-58	+	+	+	-	+	-	[83]
OXA-24	-	-	+	ceftazidim	+ (y)	-	[93]
OXA-143	+	+	+	-	+	+	[88]
OXA-235	+	+	+	-	+	+	[90]

Ghi chú: CEP: Cephalosporin; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem;

“y”: Yếu; “+”: Có khả năng thủy phân; “-”: Không có khả năng thủy phân

Nhìn chung các OXA ở *A. baumannii* có khả năng thủy phân penicillin, oxacillin, cephalosporin phổ hẹp và carbapenem. Nhưng tất cả các OXA ở *A. baumannii* không thủy phân được cephalosporin phổ rộng (Bảng 1.3). Tuy nhiên, mức độ thủy phân KS của các OXA này khác nhau. Các beta-lactamase nhóm D thường không bị ức chế bởi acid clavulanic, sulbactam, tazobactam [94].

Enzym OXA-51 thủy phân oxacillin và cloxacillin kém hơn hai lần so với cephaloridine; cephaloridine là cephalosporin duy nhất được thủy phân bởi OXA-51. Quá trình thủy phân imipenem yếu bởi OXA-51 đã được phát hiện, nhưng không thủy phân được meropenem [91]. Các chủng *A. baumannii* có duy nhất gen *bla*_{OXA-51-like}, thì chỉ những chủng có *ISAbal* ở vùng thượng nguồn của gen *bla*_{OXA-51-like} mới biểu hiện kháng carbapenem [65].

Đánh giá khả năng đề kháng carbapenem của chủng mang gen *bla*_{OXA-23}, nghiên cứu nhân gen *bla*_{OXA-23} và chuyển vào dòng *A. baumannii* ATCC 17978 nhạy cảm với carbapenem. Kết quả: Sản xuất OXA-23 ở dòng lai của *A. baumannii* ATCC 17978 đã làm tăng MICs của imipenem (16 µg/ml) và meropenem (64 µg/ml) lên gấp 128 lần và của doripenem (32 µg/ml) và ertapenem (256µg/ml) lên 64 lần so với chủng ban đầu. Tất cả các giá trị MIC này đều quan trọng về mặt lâm sàng và xác định chủng vi khuẩn mang gen *bla*_{OXA-23} có khả năng kháng carbapenems [95].

Khác với gen *bla*_{OXA-51-like}, tỷ lệ chủng có *ISAbal* ở vùng trước của gen *bla*_{OXA-23-like} cao (71,4-100%) [65],[96]. Tất cả các chủng có *ISAbal* được tìm thấy ở phía trước của gen *bla*_{OXA-23-like} (n = 69) đều đề kháng với carbapenems, trong khi chủng duy nhất không có *ISAbal* gần gen *bla*_{OXA-23-like} thì nhạy cảm với carbapenems [66]. Trong một nghiên cứu khác, *A. baumannii* với plasmid mang *bla*_{OXA-23-like} hoặc *bla*_{OXA-58-like} tự nhiên có mức độ kháng carbapenem cao hơn so với các biến thể với plasmid tái tổ hợp

pOXA-23 hoặc pOXA-58. Như vậy, các trình tự chèn IS có thể gây ra mức biểu hiện cao hơn của những gen này [83].

OXA-58 có hoạt tính beta-lactamase yếu, phổ thủy phân hẹp [83]. Khi chèn *bla*_{OXA-58} vào chủng *A. baumannii* nhạy cảm với carbapenem thì chỉ làm tăng giá trị MIC của carbapenem nhưng chưa tạo ra được dòng đề kháng carbapenem [97]. Tuy nhiên, nếu chèn *bla*_{OXA-58} vào chủng *A. baumannii* có hệ thống bơm đẩy AdeABC, khi đó đã làm tăng mức biểu hiện của hệ thống bơm đẩy AdeABC và tạo ra một dòng kháng thuốc [83].

Enzym OXA-40/24 có khả năng thủy phân benzylpenicillin và cephaloridine, ceftazidime nhưng không thủy phân được oxacillin do OXA-40/24 có vị trí hoạt động bị giới hạn nên chất nền có cấu trúc lớn như oxacillin khó tiếp cận đến vị trí hoạt động của OXA-40/24 [98]. Đối với carbapenem, OXA-40/24 có khả năng thủy phân imipenem ở mức độ thấp, nhưng không thủy phân được meropenem [93].

OXA-143 có khả năng thủy phân hẹp, bao gồm hầu hết là penicillin, oxacillin, meropenem và imipenem nhưng không thủy phân được cephalosporin phổ rộng (bảng 7) [88]. Nhìn chung, các hoạt động xúc tác của OXA-143 tương tự như của OXA-58 hoặc OXA-40/24.

OXA-235 thủy phân penicillin và carbapenem nhưng không thủy phân được cephalosporin phổ rộng tương tự như với các CHDL khác. Khả năng thủy phân oxacillin của OXA-235 mạnh hơn 1.000 lần so với OXA-24 nhưng đối với carbapenem lại thấp hơn 5 lần [90].

1.3.2.2. Nhóm MBL ở *A. baumannii*

Đặc điểm dịch tễ của một số MBL thường gặp ở *A. baumannii*

Mặc dù MBLs không phải là các carbapenemases chủ yếu ở *A. baumannii*, nhưng 1 số MBL đã được xác định ở *A. baumannii*, như NDM, IMP, VIM đã góp phần làm tăng sức đề kháng của vi khuẩn này đối với carbapenem [99],[100].

Đặc biệt, các gen này thường nằm trong gen cassette trên các integron. Khi các integron này kết hợp với plasmid hoặc transposon thì việc chuyển giao giữa các vi khuẩn được dễ dàng.

*** Gen bla_{NDM-1} (New Delhi Metallo – beta – lactamase)**

Gen bla_{NDM-1} là loại MBL được phát hiện năm 2008 từ một chủng *K. pneumoniae*. Nhưng đã có nghiên cứu hồi cứu phát hiện bla_{NDM-1} ở các chủng *A. baumannii* phân lập tại Ấn Độ năm 2005. Những phát hiện này cùng với phân tích cấu trúc di truyền tương thích với giả thuyết rằng bla_{NDM-1} có thể đã được phổ biến từ *Acinetobacter* sang *Enterobacteriaceae* ở Nam Á [101].

Mặc dù được phát hiện gần đây, nhưng bla_{NDM-1} ngày càng được báo cáo nhiều ở các chủng *A. baumannii* trên toàn thế giới. Đặc biệt phổ biến hơn ở Trung quốc và Ấn Độ [99],[102]. Ở *A. baumannii* đã quan sát thấy gen bla_{NDM-1} nằm trên cả nhiễm sắc thể và plasmid [99],[101] và gen này thường nằm trong transposon hỗn hợp Tn125 với ISAbal25 ở 2 đầu [103]. Hầu hết các plasmid mang gen bla_{NDM-1} đều có thể chuyển được và có khả năng sắp xếp lại, cho thấy khả năng linh hoạt của gen này cho phép chúng đa dạng và lây lan giữa các quần thể vi khuẩn với khả năng đáng báo động.

***Gen bla_{IMP} (Imipenemsae)**

Gen bla_{IMP} được xác định lần đầu tiên ở các chủng *Pseudomonase aeruginosa* phân lập được tại Nhật Bản năm 1988. Đồng thời, gen này cũng được báo cáo đầu tiên ở các chủng *A. baumannii* phân lập được tại Nhật Bản năm 1994 -1996 [104].

Hiện nay, gen bla_{IMP} đã được phát hiện ở các chủng vi khuẩn tại nhiều nơi trên thế giới. Tuy nhiên, gen bla_{IMP} rất thường gặp ở các chủng CRAB ở Brazil [105]. Gen bla_{IMP} dường như dễ dàng bị mất sau khi lưu trữ lâu dài trong môi trường không có KS imipenem [104].

*** Gen *bla*_{VIM} (Verona integron-encoded MBLs)**

Gen *bla*_{VIM-1}, lần đầu tiên được báo cáo ở *Pseudomonas aeruginosa* từ một bệnh nhân tại bệnh viện Đại học Verona của Italia năm 1999. Gen *bla*_{VIM} được phát hiện chủ yếu ở *P. aeruginosa* và các vi khuẩn Gram âm khác như *Enterobacteriaceae*. Tuy nhiên, gen *bla*_{VIM} cũng đã được báo cáo ở *A. baumannii* [106].

*** Gen *bla*_{GIM} (German imipenemase)**

Gen *bla*_{GIM-1} rất hiếm gặp kể từ sau lần đầu được phát hiện ở chủng *P. aeruginosa* phân lập tại Đức vào năm 2002. Có thể do gen *bla*_{GIM-1} nằm trên plasmid không liên hợp nên không dễ dàng được lan truyền như các gen *bla*_{IMP} hoặc *bla*_{VIM} [107].

*** Gen *bla*_{SPM} (Sao Paulo metallo-β-lactamase)**

Gen *bla*_{SPM-1} lần đầu tiên được phát hiện ở *P. aeruginosa* phân lập tại Sao Paulo (Brazil). Kể từ báo cáo ban đầu, các dòng vô tính *P. aeruginosa* mang *bla*_{SPM-1} đã gây ra nhiều đợt nhiễm khuẩn bệnh viện với tỷ lệ tử vong cao ở Brazil [108].

Mặc dù chủ yếu được phát hiện ở *P. aeruginosa* tại Brazil, gen *bla*_{SPM-1} cũng đã được phát hiện ở *A. baumannii* [109].

Khả năng thủy phân KS của MBLs

Tất cả các loại MBLs có khả năng thủy phân mạnh và rộng với tất cả beta-lactam (ngoại trừ monobactam) [110],[111]. Hơn nữa, chúng không bị ức chế bởi các chất ức chế như axit clavulanic, sulbactam, tazobactam [112]. MBLs là mối đe dọa lâm sàng do phổ hoạt động của chúng, đồng thời các gen này và gen mã hóa KS aminoglycoside thường được liên kết về mặt di truyền.

Enzyme NDM-1 có một vị trí hoạt động mở rộng với một cấu hình tĩnh điện dẫn đến độ đặc hiệu với cơ chất rộng hơn [113]. Gen *bla*_{NDM-1} khi được kết hợp với ít nhất một IS*Aba125* làm tăng hoạt tính của enzyme NDM-1 do được cung cấp một promoter mạnh [114],[111].

Gen *bla*_{IMP} có thể được truyền qua hình thức tiếp hợp với một chủng nhạy cảm với imепенem (IPM). Khi đó, chủng nhận được gen *bla*_{IMP} có khả năng đề kháng với IPM, CAZ, cefotaxime (CTX), ampicillin (AMP) và piperacillin (PIP) [104].

1.3.3. Nghiên cứu gen mã hóa carbapenemase và tình hình đề kháng carbapenem của *A. baumannii* tại Việt Nam

1.3.3.1. Tình hình đề kháng carbapenem của A. baumannii

Trong những năm gần đây, *A. baumannii* là một trong ba căn nguyên quan trọng hàng đầu gây nhiễm khuẩn bệnh viện tại Việt Nam và khả năng đề kháng KS của vi khuẩn này đang ở mức báo động [16],[17].

Theo kết quả nghiên cứu tại 15 ICU ở Việt Nam (năm 2012-2013), 726 chủng vi khuẩn phân lập được từ 622 mẫu bệnh phẩm nuôi cấy dương tính của 1012 bệnh nhân NKBV, thường gặp nhất là *A. baumannii* (24,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (13,8%) và *Klebsiella pneumoniae* (11,6%) với tỷ lệ đề kháng carbapenem của các VK này lần lượt là 89,2%, 55,7% và 14,9% [16].

Một nghiên cứu tại ICU Bệnh viện Bạch Mai (năm 2011 – 2015), *A. baumannii* luôn là căn nguyên đứng đầu gây NKBV, chiếm 37,1 - 43,8% trong số căn nguyên vi khuẩn Gram âm. Nhiều loại KS kể cả KS carbapenem hay aminoglycoside chỉ còn tác dụng đối với < 10% số chủng *A. baumannii* phân lập được [17].

Hơn nữa, *A. baumannii* cũng là căn nguyên đứng đầu (chiếm 51,7%) ở bệnh nhi bị viêm phổi thở máy, trong khi *P. aeruginosa* và *Klebsiella pneumoniae* chiếm tỷ lệ thấp hơn hẳn (16,8% và 12,1%). Tỷ lệ đề kháng KS của *A. baumannii* cũng rất cao, gần 90% đối với carbapenem [115].

Giá trị MIC của carbapenem đối với *A. baumannii* cũng có sự gia tăng theo thời gian ở một số nghiên cứu. Theo kết quả nghiên cứu trên 70 chủng *A. baumannii* phân lập được trên các bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết tại một số bệnh viện ở 3 miền của Việt Nam năm 2011 – 2012, MIC của carbapenem

cao nhất là 16 µg/ml [19]. Trong khi đó, giá trị MIC > 32 µg/ml được xác định cho 109/117 (91,6%) số chủng *A. baumannii* đề kháng với carbapenem phân lập được từ 3 bệnh viện ở miền Nam năm 2012 - 2014 [20].

Hiện nay, theo báo cáo ở một số bệnh viện lớn tuyến trung ương, *A. baumannii* kháng gần như 100% với tất cả các KS hiện đang sử dụng trên lâm sàng ngoại trừ colistin [18],[59].

Cũng tương tự như một số nghiên cứu trên thế giới, một số nghiên cứu ở Việt Nam về mức độ nhạy cảm/đề kháng của *A. baumannii* với colistin rất khác nhau. Một số nghiên cứu cho thấy, *A. baumannii* còn nhạy cảm 100% với colistin và với giá trị MIC thấp [17],[19],[22],[23],[115]. Ngược lại, có nghiên cứu cho kết quả tỷ lệ *A. baumannii* kháng colistin khá cao. Theo kết quả một nghiên cứu tại 2 bệnh viện ở miền Nam (năm 2012-2014), xác định *A. baumannii* kháng colistin với tỷ lệ: 1/78 (1,3%) và 12/38 (31,6%) [20]. Một nghiên cứu khác trên các chủng vi khuẩn phân lập tại một số bệnh viện Thành phố Hồ Chí Minh (2010-2014) phát hiện được 18 chủng vi khuẩn (trong đó có 7 chủng *A. baumannii*) kháng colistin, 56% số chủng có MIC \geq 32µg/ml [116]. Các nghiên cứu này sử dụng các kỹ thuật khác nhau trong việc xác định tính nhạy cảm của *A. baumannii* với colistin, như: Hệ thống máy định danh, kháng thuốc tự động (Phoenix 100 - hãng Becton Dickinson, Hoa Kỳ; VITEK2 - hãng BioMerieux, Pháp) [19],[115], phương pháp pha loãng kháng sinh trong thạch [22] và phương pháp kháng sinh khuếch tán trong thạch [20], phương pháp E-test [17],[23].

Theo một số nghiên cứu, cho thấy kết quả của một số phương pháp xác định MIC của colistin không đồng nhất, có thể cho kết quả đề kháng giả hoặc nhạy cảm giả [117],[118]. Hiện nay, phương pháp vi pha loãng trong môi trường lỏng (Broth Microdilution method) là phương pháp duy nhất được khuyến cáo sử dụng để xác định MIC của colistin [119].

1.3.3.2. Nghiên cứu các gen mã hóa carbapenemase ở A. baumannii phân lập tại Việt Nam

Một số nghiên cứu đã xác định được các gen mã hóa carbapenemase ở *A. baumannii* với tỷ lệ ngày càng phổ biến hơn. Cho đến nay, trong tất cả các nghiên cứu ở Việt Nam, carbapenemase lớp D phổ biến nhất ở *A. baumannii* [19],[21],[22],[23],[115]. Trong đó, gen *bla*_{OXA-23-like} chiếm tỷ lệ cao nhất, theo một số nghiên cứu, tỷ lệ *bla*_{OXA-23-like} là: 57,1%, 81,3%, 85,3%, 91,6%, 98,4% [19],[20],[21],[115],[120]. Đặc biệt, trong một nghiên cứu trên các chủng *A. baumannii* phân lập từ bệnh nhân nhi viêm phổi thở máy, tỷ lệ *bla*_{OXA-23-like} rất cao (91,6%) [115]. Điều này hoàn toàn phù hợp với sự phổ biến của *bla*_{OXA-23-like} là gen mã hóa carbapenemase chủ yếu ở các chủng *A. baumannii* kháng carbapenem trên toàn thế giới [8]. Trong số các enzym OXA, OXA-23 có khả năng thủy phân carbapenem mạnh không như một số OXA khác. Theo kết quả nghiên cứu của Smith và CS, đối với các chủng *A. baumannii* chỉ cần mang gen *bla*_{OXA-23-like} đã có thể đề kháng với KS carbapenem mà không cần phối hợp với các cơ chế đề kháng khác [95].

Ngược lại với sự thường gặp của *bla*_{OXA-23-like}, số chủng *A. baumannii* mang gen *bla*_{OXA-58-like} thấp hơn rất nhiều. Theo một số nghiên cứu, tỷ lệ *bla*_{OXA-58-like} chỉ chiếm 10%, 10,3%, 8,3% [19],[23],[115]. Gen *bla*_{OXA-58-like} thường tìm thấy ở các chủng phân lập tại các nước châu Âu, Mỹ. Tuy OXA-58 có hoạt tính thủy phân carbapenem yếu, nhưng ở *A. baumannii* thường có nhiều gen đề kháng carbapenem khác nhau và phối hợp với các cơ chế đề kháng khác nên có thể tạo ra mức độ kháng thuốc cao. Cũng đã phát hiện, sự phối hợp 2 hoặc 3 gen mã hóa carbapenemase khác nhau trên một chủng, tuy nhiên tỷ lệ này chưa cao (thường chỉ <10%).

Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào ở Việt Nam phát hiện gen *bla*_{OXA-24/40-like} ở *A. baumannii* [23]. Một số loại *bla*_{OXA} khác cũng chưa được phát hiện.

Tuy nhiên, có thể do các nghiên cứu đã không sử dụng các cặp môi để phát hiện những gen *bla*_{OXA} này nên chưa thể khẳng định được là không có.

Ngoài các gen *bla*_{OXA} thuộc lớp D, gen *bla*_{NDM-1} và *bla*_{IMP-1} thuộc lớp B (MBL) cũng đã được xác định ở các chủng *A. baumannii* phân lập tại Việt Nam. Kết quả nghiên trên các chủng *A. baumannii* phân lập tại 2 bệnh viện Trung ương Huế và Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế năm 2016, tỷ lệ *bla*_{NDM-1} (11,8%) và *bla*_{IMP-1} (4,4%) [21]. Một nghiên cứu khác trên 582 chủng *A. baumannii* phân lập tại một số bệnh viện lớn ở Hà Nội từ năm 2010 - 2014 đã phát hiện được *bla*_{NDM-1} (4,0%) và *bla*_{IMP-1} (0,07%) [22]. Tuy số lượng các gen MBL không nhiều như các *bla*_{OXA} nhưng khả năng đề kháng của các chủng mang những gen MBL thường cao do khả năng thủy phân mạnh và rộng với tất cả beta-lactam (ngoại trừ monobactam) của MBL [110].

Đã có một số nghiên cứu chuyên sâu về kỹ thuật sinh học phân tử để có thể phân loại và đánh giá nguồn gốc cũng như khả năng lan truyền của các chủng vi khuẩn mang gen đề kháng kháng sinh. Kết quả nghiên cứu về mối liên hệ kiểu gen của một số chủng *A. baumannii* mang *bla*_{NDM-1} ở 3 bệnh viện tại Hà Nội (năm 2010-2014) bằng phương pháp điện di xung trường (Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE) cho thấy có sự lây lan vô tính của chủng *A. baumannii* mang *bla*_{NDM-1} tại một bệnh viện và giữa 2 bệnh viện [22]. Tương tự, kết quả nghiên cứu trên 76 chủng *A. baumannii* gây nhiễm khuẩn huyết phân lập từ 6 bệnh viện ở 3 miền của Việt Nam (năm 2012-2013), có mối liên hệ kiểu gen PFGE giữa các chủng trong cùng một bệnh viện và giữa các bệnh viện [121] Cần có thêm các nghiên cứu để cung cấp thêm các bằng chứng khoa học về dịch tễ học phân tử của các chủng vi khuẩn này từ đó có các giải pháp hiệu quả về vấn đề kiểm soát nhiễm khuẩn.

1.4. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN KIỂU GEN VÀ CARBAPENEMASE Ở *A. BAUMANNII*

Sinh carbapenemase là cơ chế đề kháng carbapenem chủ yếu ở *A. baumannii* và các gen mã hóa carbapenemase thường nằm trên các yếu tố di truyền di động [6], nên việc xác định sớm, chính xác các chủng vi khuẩn sinh carbapenemase là rất quan trọng để thực hiện biện pháp kiểm soát nhiễm khuẩn và lựa chọn kháng sinh phù hợp.

Do màng ngoài của *Acinetobacter* có tính thấm thấp [13] và hoạt tính enzyme của một số loại carbapenemase ở *Acinetobacter* yếu, nên việc phát hiện carbapenemase ở *Acinetobacter* khó hơn so với *Enterobacteriaceae* và *Pseudomonas spp.* [14],[15].

Một số phương pháp phát hiện carbapenemases ở vi khuẩn, gồm: Phương pháp sàng lọc kiểu hình và phương pháp dựa vào hoạt tính sinh hóa của carbapenemase [122].

1.4.1. Phương pháp phát hiện gen mã hóa carbapenemase

Phát hiện sự có mặt của các gen mã hóa carbapenemase bằng các kỹ thuật sinh học phân tử là tiêu chuẩn vàng để xác định chính xác gen mã hóa carbapenemase. Tuy nhiên, những kỹ thuật này được sử dụng chủ yếu cho nghiên cứu dịch tễ học, ít khi được thực hiện hàng ngày trong các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng do kỹ thuật tương đối phức tạp, cần trang thiết bị. Đồng thời, đôi khi sự có mặt của gen nhưng không có biểu hiện kiểu hình đề kháng. Hơn nữa, chỉ có thể phát hiện các gen mã hóa carbapenemase đã biết và được đưa vào kiểm tra, trong khi đó số lượng gen mã hóa carbapenemase và các biến thể của chúng ngày càng được phát hiện nhiều.

Một số kỹ thuật phân tử có thể được áp dụng để phát hiện gen mã hóa carbapenemase chủ yếu là phản ứng chuỗi trùng hợp (Polymerase Chain Reaction-PCR) như: PCR, multi-Real-time PCR, PCR-ELISA, LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), microarray DNA, giải trình tự gen [122]

Các kỹ thuật PCR có thể sử dụng đơn hoặc đa môi để phát hiện các gen mã hóa carbapenemase [123],[124].

Kỹ thuật Real-time PCR cho kết quả nhanh hơn và thuận tiện hơn kỹ thuật PCR thường. Van der Zee và CS đã thực hiện thành công kỹ thuật multiplex real-time PCR phát hiện đồng thời các gen *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*. [125].

PCR-ELISA là là một phương pháp miễn dịch có thể định lượng sản phẩm PCR trực tiếp và nhạy hơn nhiều so với phương pháp PCR thông thường, với thời gian phân tích ngắn hơn và giới hạn phát hiện thấp hơn [126]. PCR-ELISA đã được thử nghiệm để phát hiện KPC và MBL (ở *Enterobacteriaceae* với độ đặc hiệu cao (98,6%) và độ nhạy (98,0%) [127].

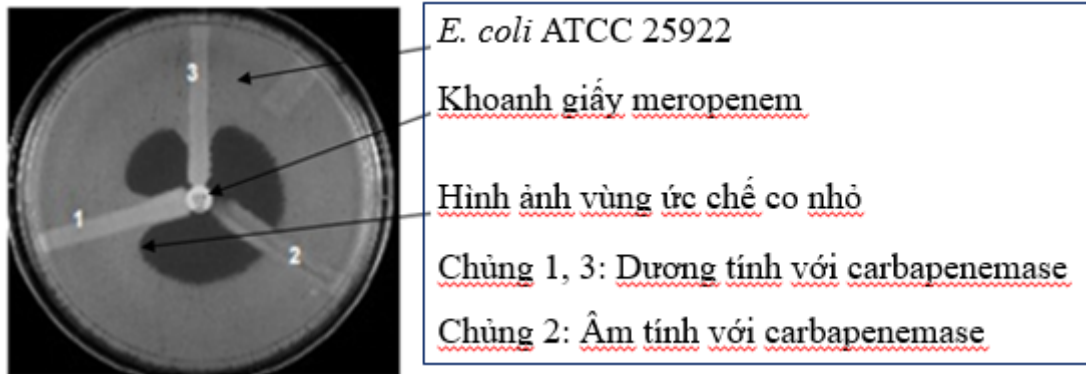
Phương pháp Microarray DNA có khả năng phát hiện đồng thời một số lượng lớn các gen khác nhau trong một thời gian ngắn. Một số kỹ thuật microarrays để phát hiện kháng thuốc ở các loài khác nhau. Simon Dally và CS đã phát triển một kỹ thuật microarray DNA để phát hiện đồng thời 91 yếu tố quyết định đề kháng trong *A. baumannii* [128].

Kỹ thuật giải trình tự gen được sử dụng để giải trình tự các gen đề kháng KS cũng như phân tích các plasmid mang gen kháng KS. Đây là một phương pháp chính xác nhất để xác định các đặc tính đề kháng KS của vi khuẩn. Tuy nhiên, kỹ thuật này đòi hỏi trang thiết bị, nhân lực, thời gian và kinh phí cao, do đó không phù hợp với phòng xét nghiệm lâm sàng.

1.4.2. Phương pháp kiểu hình phát hiện carbapenemase

Một số thử nghiệm kiểu hình được sử dụng trong thực hành lâm sàng để xác định vi khuẩn sinh carbapenemase: Modified Hodge test (MHT), Trion Hodge test (THT), carbapenem inactivation method (CIM), phương pháp dựa trên các chất ức chế carbapenemase và nuôi cấy trên các môi trường tạo màu (Chromogenic agar) [122].

1.4.2.1 Kỹ thuật Modified Hodge test (MHT)



Hình 1.6. Hình ảnh thử nghiệm MHT [129]

Nguyên lý của phương pháp: Dựa trên sự bất hoạt carbapenem bởi carbapenemase của vi khuẩn. Chủng vi khuẩn thử nghiệm nếu sinh carbapenemase sẽ ức chế hoạt động của KS carbapenem, làm cho vùng ức chế nơi giao thoa với đường cấy chủng thử nghiệm thu nhỏ lại giống như hình nan quạt (Hình 1.6) [129].

MHT là một phương pháp đã được Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm (*Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI*) (năm 2015 – 2017) khuyến cáo cho việc xác định carbapenemase ở các vi khuẩn *Enterobacteriaceae* [129].

Một số tác giả đã nghiên cứu giá trị của kỹ thuật này để phát hiện carbapenemase ở *Acinetobacter spp.* [15],[130]. Tuy nhiên, giá trị của kỹ thuật này khác nhau theo từng nghiên cứu. Độ nhạy của kỹ thuật dao động từ 0-100% phụ thuộc vào loại vi khuẩn thử nghiệm và loại carbapenemase [15],[130].

MHT có thể cho kết quả dương tính giả đối với các chủng vi khuẩn có enzym CTX-M và hoặc AmpC khi kết hợp với giảm khả năng thẩm thấu của màng ngoài vi khuẩn do giảm kênh porin [131].

1.4.2.2. Kỹ thuật Triton-Hodge test (THT)

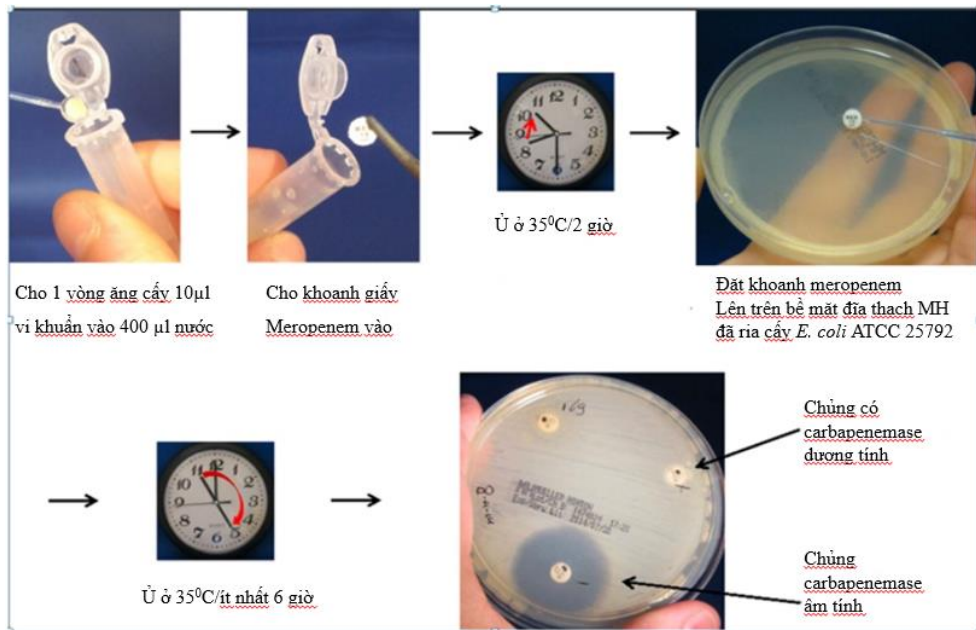
NDM là một lipoprotein gắn với màng ngoài ở vi khuẩn Gram âm, không như một số carbapenemases khác nằm ở khoang gian bào [113],[132].

Pasteran và CS đã nghiên cứu tác động gắn màng của NDM đối với khả năng phát hiện enzym này của kỹ thuật MHT, kết quả âm tính khi NDM-1 khi gắn với màng ngoài nhưng dương tính ở chủng vi khuẩn với các biến thể NDM-1 hòa tan [133].

Việc NDM-1 gắn với màng ngoài vi khuẩn đã ngăn cản sự phát hiện hoạt động carbapenemase bằng kỹ thuật MHT. Hạn chế này có thể được khắc phục bằng việc bổ sung Triton X 100 - là chất tẩy có khả năng hòa tan các protein màng ngoài của vi khuẩn, do đó làm tăng độ nhạy của kỹ thuật (từ 20% đối với MHT lên 97% đối với THT trong việc phát hiện NDM ở *Enterobacteriaceae*) mà không làm giảm độ đặc hiệu của THT so với MHT [133].

1.4.2.3. Kỹ thuật bất hoạt carbapenem (*Carbapenem Inactivation Method - CIM*)

Nguyên lý kỹ thuật: Sau khi khoan giấy meropenem được ủ với huyền dịch của chủng vi khuẩn cần kiểm tra. Nếu chủng vi khuẩn cần thử nghiệm sinh carbapenemase sẽ thủy phân meropenem, khi đó meropenem trong khoan giấy KS bị bất hoạt sẽ không thể ức chế hoặc giảm sự tăng sinh của *E. coli* ATCC 25922 (là chủng nhạy cảm với meropenem) [131].



Hình 1.7. Sơ đồ quy trình kỹ thuật CIM [134].

Kỹ thuật CIM được Zwaluw và CS báo cáo đầu tiên năm 2015 (hình 1.7) [134]. Có thể đọc kết quả sau 6 giờ, tuy nhiên nếu không cần kết quả nhanh có thể đọc kết quả sau khi ủ qua đêm. CIM có sự phù hợp cao (100% đối với *Enterobacteriaceae* và 98,8% đối với những vi khuẩn không lên men) với PCR phát hiện gen mã hóa carbapenemase [134].

Trong CLSI từ năm 2017- 2020 cũng đã có hướng dẫn thực hiện kỹ thuật mCIM (Modified CIM). Theo CLSI, kỹ thuật này có độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao với *Enterobacteriaceae* (>99%) và *P. aeruginosa* (>97 -100%), nhưng lại có độ nhạy kém và không xác nhận trong việc phát hiện carbapenemase ở *Acinetobacter spp.* [131]. Tuy nhiên, kỹ thuật mCIM theo CLSI có một số thay đổi so với kỹ thuật CIM của Zwaluw, như: thay 400µl nước bằng 2 ml TSB (Trypto-casein soy broth), tăng thời gian ủ lần 1 từ 2 tiếng lên 4 tiếng.

Theo kết quả nghiên cứu của Thao Nguyen Vu và CS, số lượng và loại dung dịch ủ, thời gian ủ làm ảnh hưởng đến sự ổn định của meropenem trong khoan giấy. Môi trường dinh dưỡng TSB là dung dịch ủ thích hợp cho mCIM so với Tris-HCl pH 7.6. Thử nghiệm tối ưu khi thay 2 ml TSB ở kỹ thuật mCIM bằng 400 µl TSB và tăng số lượng chủng vi khuẩn cần kiểm tra thì độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật CIM đều là 100% đối với việc phát hiện carbapenemase ở *A. baumannii* [135].

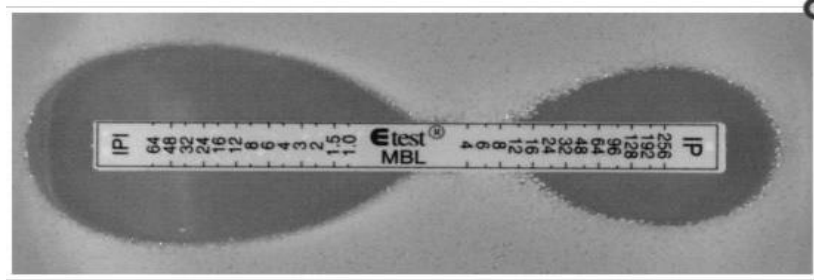
1.4.2.4. Kỹ thuật phát hiện carbapenemase dựa vào các chất ức chế carbapenemase

Các kỹ thuật phát hiện MBL: Dựa trên sự ức chế hoạt động MBL bởi các chất chelator như: ethylenediaminetetraacetic (EDTA), mercaptoacetic acid (SMA) [136], axit dipicolinic (DPA) [137].

Một số kỹ thuật sử dụng nguyên lý này như: E-test MBL, khoan giấy hiệp đồng, khoan giấy kết hợp.

** Sử dụng thanh E-test MBL:*

Thanh E- test MBL có chứa Imipenem (IP) (với các nồng độ khác nhau 4 - 256 $\mu\text{g/ml}$) và Imipenem (với các nồng độ từ 1 - 64 $\mu\text{g/ml}$) kết hợp với EDTA với nồng độ hằng định (IPI). Khi MIC của IPI lớn hơn MIC của IP $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ lần thì chủng VK thử nghiệm dương tính với MBL [142].

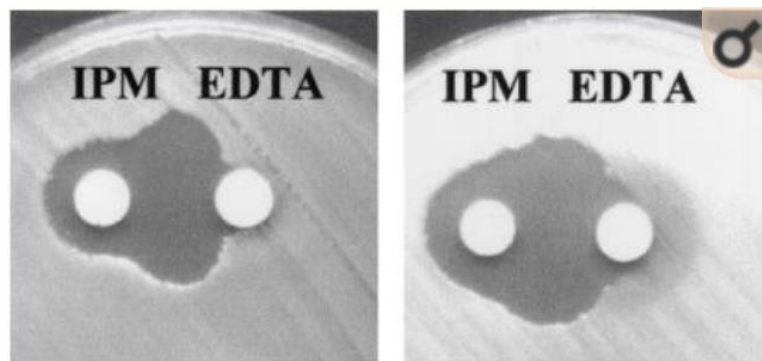


Hình 1.8. Kỹ thuật E-test MBL [138]

Theo một số nghiên cứu, E-test MBL có độ nhạy cao 94 -100% đối với các chủng sản xuất MBL [15],[130]. Tuy nhiên, một số chủng có OXA-23 hoặc OXA-40 có thể cho kết quả dương tính giả với E-test MBL do EDTA có thể ức chế sự phát triển của vi khuẩn [15],[136].

** Kỹ thuật khoan giấy hiệp đồng:*

Chủng vi khuẩn cần thử nghiệm được ria cấy lên môi trường MHA như với kỹ thuật kháng sinh đồ. Khoan giấy chứa carbapenem được đặt cạnh khoan giấy chứa chất ức chế carbapenemase (khoảng cách giữa 2 mép khoan giấy khoảng 10-15mm). Sau khi ủ qua đêm ở 37⁰C, sự hiện diện của một vùng ức chế mở rộng giữa hai khoan giấy (Hình 1.9), chủng vi khuẩn đó dương tính với MBL [136],[130]



Hình 1.9. Kỹ thuật khoan giấy hiệp đồng phát hiện MBL [136]

** Kỹ thuật khoan giấy kết hợp*

Một khoan giấy chứa carbapenem và một khoan giấy kết hợp chứa carbapenem với chất ức chế carbapenemase được đặt lên môi trường MHA đã ria cấy chủng vi khuẩn cần kiểm tra. Với chủng sinh men MBL, đường kính vùng ức chế xung quanh khoan giấy kết hợp lớn hơn ≥ 7 mm so với khoan giấy chỉ có carbapenem [130].

** Phát hiện vi khuẩn sinh carbapenemase trên môi trường tạo màu*

Một số môi trường có thể sử dụng để phát hiện vi khuẩn sinh carbapenemase, như CHROMagar KPC, ChromID CARBA, Brilliance™ CRE Agar and SUPERCARBA [122]. Tuy nhiên các môi trường này chủ yếu được sử dụng để phát hiện KPC và một số carbapenemase thường gặp ở *Enterobacteriaceae*.

1.4.3. Phương pháp sinh hóa xác định hoạt tính enzyme carbapenemase

Phương pháp xác định carbapenemase dựa trên tính chất thủy phân carbapenem của carbapenemase.

1.4.3.1. Kỹ thuật quang phổ

Chủng vi khuẩn cần kiểm tra được ủ với carbapenem, phát hiện vi khuẩn sản xuất carbapenemase bằng đo quang phổ của carbapenem và sản phẩm thủy phân của nó bằng máy quang phổ tia cực tím (UV) [139], máy MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) [140].

Nghiên cứu trên 106 chủng *A. baumannii*, MALDI-TOF có độ nhạy và độ đặc hiệu 100% đối với việc phát hiện carbapenemases [140]. Tuy nhiên, kỹ thuật này là cần trang thiết bị đắt tiền nên khó sử dụng thường quy để xác định các chủng sinh carbapenemases trong tất cả các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

1.4.3.2. Kỹ thuật Carba NP (Carbapenemase Nordmann–Poirel test)

Carba NP là một kỹ thuật để phát hiện carbapenemase ở *Enterobacteriaceae* đã được Nordmann và Poirel báo cáo đầu tiên năm 2012 [141]. Sau đó, kỹ thuật này cũng đã được nghiên cứu thực hiện để phát hiện carbapenemase ở *Pseudomonase*, *Acinetobacter* [142]. Từ CLSI năm 2015 đến 2017 cũng đã có hướng dẫn thực hiện kỹ thuật này đối với *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp* [143]. Tuy nhiên, kỹ thuật này không còn được khuyến nghị cho *Acinetobacter spp.* trong CLSI năm 2018 [131].



Hình 1.10. Hình ảnh thử nghiệm CarbaNP [131]

Kỹ thuật này dựa trên sự thủy phân carbapenem bởi carbapenemase của vi khuẩn làm giảm pH và được phát hiện nhờ chỉ thị đỏ phenol (Chuyển từ màu đỏ sang màu vàng hoặc cam) (Hình 1.10) [141].

CarbaNP được báo cáo có độ nhạy và độ đặc hiệu 100% so với kỹ thuật PCR cho việc phát hiện carbapenemase ở *Enterobacteriaceae* [141], nhưng không phát hiện được các loại OXA là loại carbapenemases phổ biến ở *Acinetobacter spp.* [14],[131].

1.4.3.3 Thử nghiệm CarbAcineto NP

Dortet và CS đã sửa đổi thử nghiệm CarbaNP để tăng độ nhạy của kỹ thuật trong việc phát hiện các loại carbapenemase ở *Acinetobacter spp.* [14].

Thử nghiệm CarbAcineto NP [14] có 1 số điểm thay đổi so với CarbaNP [141]: (i) Tăng gấp đôi số lượng vi khuẩn cần thử nghiệm để tăng lượng enzyme được giải phóng; (ii) Sử dụng NaCl 5M thay cho Tris HCl pH 7,4 để tránh tác dụng đệm của Tris HCl do hoạt tính enzyme carbapenemase (đặc biệt là các loại OXA) của *Acinetobacter* yếu nên lượng acid sinh ra ít không đủ làm đổi màu.

Thử nghiệm CarbAcineto NP có khả năng phát hiện carbapenemase ở *Acinetobacter spp* với độ nhạy 94,7% và độ đặc hiệu 100%. CarbAcinet NP chỉ không phát hiện được enzyme GES và OXA-51 [14]. Thử nghiệm Carba NP và CarbAcinetoNP ngoài độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao trong việc phát hiện carbapenemase, thời gian phát hiện nhanh (có thể phát hiện được trong vòng 15 phút và tối đa là 2 giờ) [141]. Thử nghiệm này có chi phí hơi cao nếu sử dụng bột imipenem monohydrat (Khoảng 150.000 đồng). Tuy nhiên, một số tác giả đã cải tiến kỹ thuật này bằng sử dụng sử dụng bột thuốc tiêm Tienam (có chứa kháng sinh imipenem) để có chi phí thấp hơn (khoảng 10.000 đồng) [144].

Hiện nay, trên thị trường có một số kit thương mại cung cấp một giải pháp nhanh, thuận tiện cho việc phát hiện sớm carbapenemase của vi khuẩn như RAPIDEC CARBA NP (Của hãng BioMerieux) có độ nhạy và độ đặc hiệu là 96% đối với việc phát hiện carbapenemase ở vi khuẩn (bao gồm cả *Acinetobacter sp* [145]). Tuy nhiên, chi phí của các loại kit này cao (khoảng 500.000 đồng VN/1 test thử).

1.4.4. Một số phương pháp nghiên cứu khả năng lan truyền của các chủng vi khuẩn mang gen đề kháng kháng sinh ở mức độ phân tử

1.4.4.1. Phương pháp điện di xung trường (Pulse field gel electrophoresis-PFGE).

Kỹ thuật PFGE có khả năng tách những đoạn ADN có kích thước rất lớn (> 50 kb) dựa trên nguyên tắc đổi hướng định kỳ điện trường xung trong quá trình điện di.

Sử dụng kỹ thuật PFGE để phân tách các đoạn ADN trên nhiễm sắc thể sau khi được cắt bằng các enzym giới hạn. Phân tích kết quả về kiểu gen, dựa trên sự tương đồng của các đoạn ADN để xác định mức độ tương đồng về kiểu gen của các chủng vi khuẩn.

PFGE cho đến hiện nay vẫn được xem là "tiêu chuẩn vàng - gold standard" cùng với các phương pháp cải tiến hơn như phương pháp phân loại trình tự đa vị trí để nghiên cứu về dịch tễ học phân tử của các chủng vi khuẩn trong đó đánh giá sự lây truyền của các vi khuẩn gây bệnh trong bệnh viện và cộng đồng

có kháng kháng sinh hiện nay. Quá trình phân tích dựa trên sự so sánh các đoạn ADN của các chủng vi khuẩn để xác định mối liên quan và nguồn gốc của các chủng vi khuẩn ở các vùng và thời gian khác nhau

Hiện nay, điện di xung trường (PFGE) là kỹ thuật sinh học phân tử được nhiều nhà khoa học sử dụng để nghiên cứu và đánh giá sự lây truyền của các vi khuẩn gây bệnh trong bệnh viện và cộng đồng.

1.4.4.2. Phương pháp phân loại trình tự đa vị trí (Multiple locus sequence typing- MLST)

Phương pháp MLST giúp phân loại các chủng vi khuẩn dựa vào trình tự của một số (thường là 7) gen "giữ nhà" (gen house-keeping) trong hệ gen bằng kỹ thuật giải trình tự gen.

Ưu điểm của phương pháp MLST là dữ liệu trình tự rất rõ ràng và có thể dễ dàng so sánh đối chiếu với cơ sở dữ liệu trên mạng trái ngược với các phương pháp phân loại khác dựa vào kích thước của đoạn ADN trên bản thạch. Nhược điểm chủ yếu của phương pháp này là tốn thời gian và chi phí cao.

1.5. TÍNH CẤP THIẾT CỦA LUẬN ÁN

Hiện nay, *A. baumannii* kháng carbapenem là một vấn đề sức khỏe toàn cầu cần được ưu tiên số 1 trong việc kiểm soát, điều trị và Việt Nam cũng không nằm ngoài tình trạng đó. Phát hiện sớm các chủng vi khuẩn sinh carbapenemase là rất cần thiết trong việc kiểm soát sự lây nhiễm và lựa chọn kháng sinh thích hợp trong điều trị. Tuy nhiên hiện nay, chưa có nghiên cứu nào nghiên cứu về phương pháp phát hiện carbapenemase ở các chủng *A. baumannii* lưu hành tại Việt Nam để xác nhận phương pháp phù hợp cho thực hành thường quy tại các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

Xác định mối liên hệ kiểu gen và kiểu hình đề kháng kháng sinh của các chủng *A. baumannii* là cơ sở khoa học cung cấp thêm các thông tin hữu ích về nguồn gốc, sự lây lan và khả năng tích hợp gen đề kháng kháng sinh thông qua các phương thức truyền gen ngang trong số các chủng *A. baumannii* lưu hành ở Việt Nam.

Hơn nữa, cần đánh giá mức độ nhạy cảm với colistin trên các chủng *A. baumannii* ở Việt Nam bằng phương pháp chuẩn (phương pháp vi pha loãng trong môi trường lỏng – Broth Microdilution Method) để xác định MIC của colistin vì giá trị MIC của colistin không chỉ để xác định tính nhạy/kháng của vi khuẩn với colistin mà còn giúp xác định liều colistin sử dụng trên lâm sàng để có hiệu quả điều trị tốt nhất cho người bệnh và hạn chế tình trạng kháng thuốc. Đây là “vũ khí” cuối cùng trong điều trị nhiễm trùng do *A. baumannii* đa kháng.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

144 chủng *A. baumannii* phân lập được từ bệnh nhân bị nhiễm khuẩn ở 9 bệnh viện thuộc 3 miền của Việt Nam năm 2016.

- Miền Bắc: Gồm 04 bệnh viện (Thanh Nhàn, Xanh Pôn, Bắc Giang, Trung ương Quân đội 108).

- Miền Trung: Gồm 03 bệnh viện (Trung ương Huế, Nghệ An, Hà Tĩnh).

- Miền Nam: Gồm 02 bệnh viện (Chợ Rẫy, Nhi Đồng 1).

Do phương pháp xác định kiểu hình có thể cho kết quả không chính xác khi xác định loài của *Acinetobacter* (đặc biệt đối với các loài thuộc phức hợp *Acinetobacter calcoaceticus* - *A. baumannii* complex) [77],[78],[79]. Ở nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu đã thực hiện phối hợp một số tính chất kiểu hình (theo mục 2.5.1), kiểu gen (*bla*_{OXA-51-like}) và định danh bằng công nghệ khối phổ (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight - MALDI TOF) để xác định *A. baumannii*.

Kết quả, 144/151 chủng dương tính với *bla*_{OXA-51-like} cũng có kết quả định danh là *A. baumannii* bằng máy MALDI Biotyper - Bruker (kết quả được trình bày tại phụ lục 1) tiếp tục đưa vào các phân tích tiếp theo.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

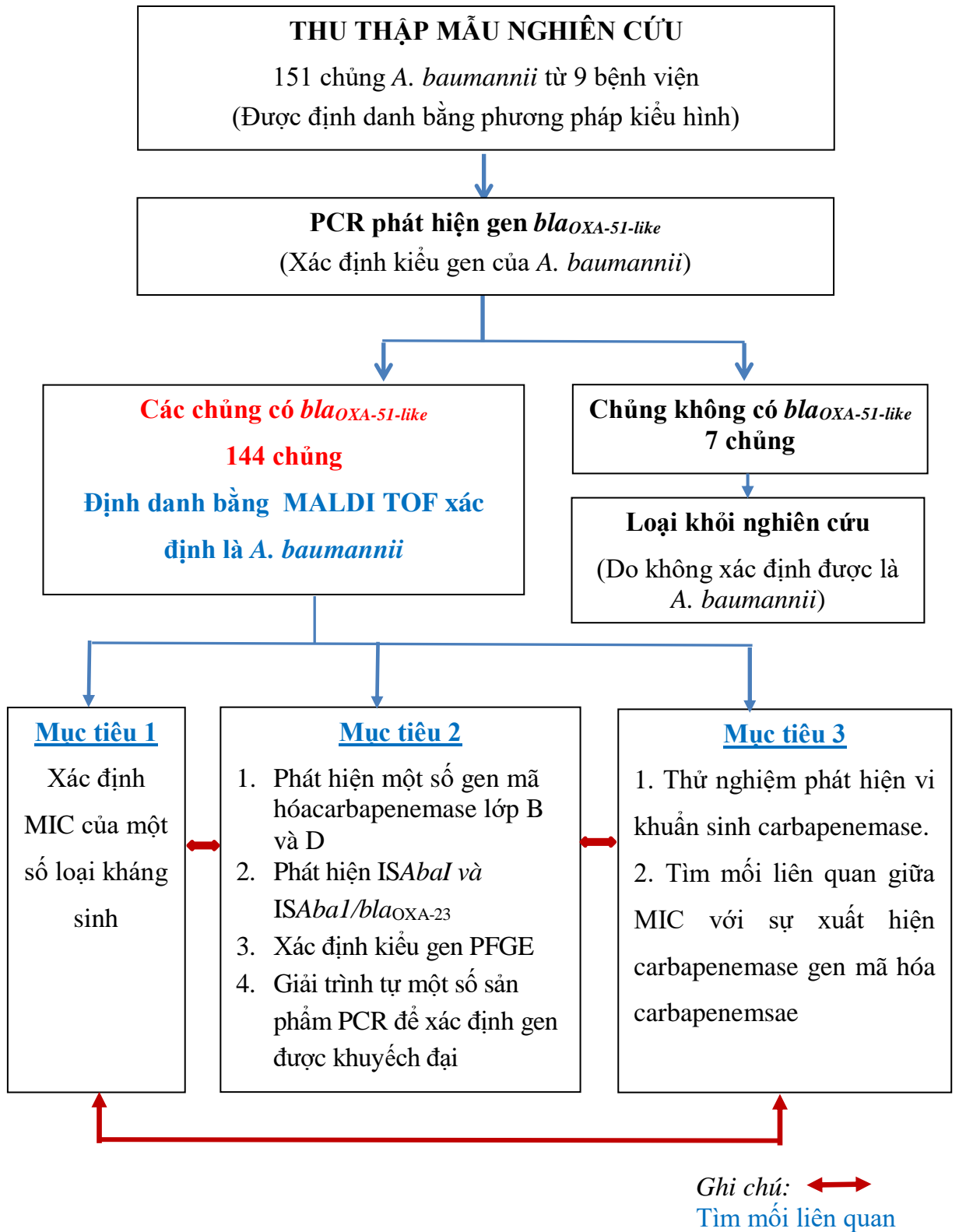
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu mô tả và thử nghiệm trong phòng thí nghiệm.

2.2.2. Chọn mẫu và cỡ mẫu

Tổng số mẫu dự kiến là 150 chủng *A. baumannii* phân lập được từ bệnh nhân nhiễm khuẩn ở một số bệnh viện thuộc miền Bắc, miền Trung, miền Nam của Việt Nam năm 2016. Chọn có chủ đích một số bệnh viện đại diện ở 3 miền của Việt Nam. Các chủng được lấy ngẫu nhiên, không trùng lặp, thông tin chủng gồm: Tên chủng, mã bệnh phẩm, ngày thu thập, loại bệnh phẩm.

2.3. SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

2.4. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được thực hiện trong thời gian từ 2016 - 2019.

Địa điểm nghiên cứu: Thực hiện các kỹ thuật nghiên cứu tại Phòng Kháng kháng sinh - Viện vệ sinh Dịch tễ Trung ương (VSDTTU).

2.5. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

2.5.1. Thu thập và lưu giữ mẫu nghiên cứu

Các chủng nghiên cứu sau khi được chuyển về Viện VSDTTU, được cấy chuyển sang môi trường MacConkey agar, ủ ở 35-37°C/18-24 giờ.

Chọn những khuẩn lạc tròn, lồi, trơn bóng, màu hồng nhạt (do sinh acid yếu từ glucose), đường kính khoảng 2 cm, tiến hành: (i) Nhuộm Gram: có hình ảnh cầu - trực khuẩn Gram âm; (ii) xác định một số tính chất sinh vật hóa học: không lên men đường glucose, lactose; catalase (dương tính), oxidase (âm tính), không di động, simmons citrat (âm tính), Red Methyl (âm tính), Voges-Proskauer (âm tính).

Cấy chuyển sang môi trường Luria-Bertani agar, ủ ở 35-37°C/18-24 giờ.

Chọn khuẩn lạc thuần, tiến hành kỹ thuật PCR phát hiện gen *bla*_{OXA-51-like} (theo mục 2.5.2). Các chủng dương tính với gen *bla*_{OXA-51-like} được xác định là *A. baumannii* (về kiểu gen), tiến hành lưu chủng trong môi trường dung dịch Luria-Bertani (Invitrogen, Mỹ) + 25% glycerol (Merck, Đức), bảo quản ở -70 đến -80°C.

2.5.2. Kỹ thuật PCR phát hiện gen *bla*_{OXA-51-like} ở các chủng *A. baumannii*

2.5.2.1. Tách chiết ADN của vi khuẩn

Tế bào vi khuẩn được ly giải trong nước cất vô trùng bằng phương pháp tách nhiệt: Vi khuẩn được nuôi cấy thuần, ở 37°C qua đêm trên môi trường thạch đĩa LB (Luria-Bertani), lấy 3-4 khuẩn lạc hòa vào 200µl nước cất vô trùng, ủ ở 95°C/5 phút, ly tâm 13.000 vòng/phút x 15 phút, loại bỏ cặn và giữ lại nước nổi có chứa ADN để sử dụng làm khuôn mẫu cho kỹ thuật PCR. Bảo quản dung dịch chứa ADN ở -20°C.

2.5.2.2. Kỹ thuật PCR

- Sử dụng các đoạn môi đặc hiệu cho gen *bla*_{OXA-51-like} (bảng 2.1).

Bảng 2.1. Trình tự môi đặc hiệu cho gen *bla*_{OXA-51-like}

Gen được phát hiện	Môi	Trình tự môi (5' – 3')	Kích thước (bp)	Tài liệu tham khảo
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	OXA-51-F	taa tgc ttt gat cgg cct tg	353	Woodford, N et al, 2006 [124]
	OXA-51-R	tgg att gca ctt cat ctt gg		

- Thành phần phản ứng:

- + 25 µl 2X Go Taq Master Mix (Promega);
- + 0,4 µl môi nồng độ 10 pmol (02 µl môi xuôi, 0,2 µl môi ngược);
- + 5 µl ADN của mỗi mẫu kiểm tra;
- + 19,6 µl nước siêu sạch.

- Chu trình nhiệt của phản ứng: 94⁰C trong 5 phút; [94⁰C trong 25 giây, 52⁰C trong 40 giây, 72⁰C trong 50 giây] x 30 chu kỳ; 72⁰C trong 6 phút] [124].

- Kiểm soát chất lượng phản ứng PCR bằng chứng dương và chứng âm. Chứng dương là ADN tách chiết từ các chủng *A. baumannii* mang gen *bla*_{OXA-51-like} do Viện Quốc gia các bệnh truyền nhiễm Nhật Bản cung cấp (được lưu giữ tại phòng Kháng sinh – Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương). Đối với chứng âm, thay 5 µl ADN của mẫu bằng 5 µl nước cất hai lần.

- Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% trong TAE 1X (Invitrogen, Mỹ), rồi soi và chụp ảnh gel (UVP BioDoc-It ® Imaging Systems, Mỹ).

- Kết quả phản ứng PCR được xem là đạt yêu cầu khi chứng dương có 1 băng duy nhất, sáng rõ, đặc hiệu và đúng kích thước, chứng âm không có băng hiển thị.

- Phân tích kết quả: Xác định chủng vi khuẩn mang gen khi xuất hiện băng (band) có cùng kích thước với chứng dương tương ứng.

Đại diện sản phẩm khuếch đại PCR tương ứng với kích thước gen đích được giải trình tự gen và đối chiếu với trình tự gen đích trên cơ sở dữ liệu của Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia, Hoa Kỳ (National Center for Biotechnology Information - NCBI) tại địa chỉ: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Yêu cầu kết quả phải cho độ tương đồng > 95%.

2.5.3. Kỹ thuật xác định nồng độ tối thiểu ức chế vi khuẩn phát triển (Minimum Inhibitory Concentrations - MIC) của kháng sinh

Phương pháp pha loãng kháng sinh trong thạch được thực hiện đối với các kháng sinh: imipenem (IPM), meropenem (MEM), doripenem (DOR) ceftazidime (CAZ), cefepime (CPM), levofloxacin (LEV), amikacin (AK) minocycline (MI).

Phương pháp vi pha loãng trong môi trường lỏng (Microdilution broth) được thực hiện đối với colistin.

Kỹ thuật được thực hiện theo hướng dẫn của Viện chuẩn thức xét nghiệm lâm sàng Hoa Kỳ (CLSI M07-A10) năm 2015 [146].

2.5.3.1. Kỹ thuật xác định MIC bằng phương pháp pha loãng kháng sinh trong thạch

Kỹ thuật được thực hiện theo hướng dẫn của CLSI (CLSI M07-A10) [146].

- Sử dụng bột kháng sinh chuẩn của hãng Sigma (Mỹ). Chuẩn bị các đĩa thạch Mueller-Hinton có chứa kháng sinh theo các nồng độ pha loãng bậc 2 (như bảng 2.2).

Bảng 2.2. Nồng độ các kháng sinh pha loãng bậc 2

TT	Loại KS	Nồng độ KS pha loãng bậc 2 ($\mu\text{g/ml}$)	
		Nồng độ cao nhất	Nồng độ thấp nhất
1	Meropenem	64	0,004
2	Imipenem	64	0,03
3	Doripenem	64	0,004
4	Ceftazidime	128	0,03
5	Cefepime	128	0,008
6	Levofloxacin	64	0,004
7	Amikacin	256	0,03
8	Minocyclin	128	0,003

- Ria cây chủng chuẩn *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 và các chủng nghiên cứu trên các đĩa thạch Mueller Hinton (Becton Dickinson, Mỹ), ủ ở 35-37°C trong 18-24 giờ.

- Chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn có độ đục tương đương với độ đục McFarland 0,5 (khi đó huyền dịch có nồng độ khoảng $1-2 \times 10^8$ vi khuẩn/ml). Pha loãng huyền dịch trên 10 lần (lấy 500 μl huyền dịch này cho vào 5 ml nước muối sinh lý vô trùng) để được huyền dịch có nồng độ 10^7 vi khuẩn/ml.

- Hút 0,5 ml huyền dịch vi khuẩn (nồng độ 10^7 vi khuẩn/ml) cho vào mỗi giếng của phiến inox 32 giếng (Hình 2.1) theo sơ đồ mẫu của các chủng (hình 2.2).

**Hình 2.1. Phiến inox 32 giếng và bộ đinh cấy (Thụy Điển sản xuất)**

	Chủng chuẩn 1	1	2	3	
4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27
	28	29	30	Chủng chuẩn 2	

Hình 2.2. Sơ đồ vị trí mẫu trên phiến inox 32 giếng

- Dùng bộ đỉnh cây inox 32 đầu (đường kính mỗi đầu chân là 3mm). Châm vào các giếng trên phiến, sau đó đặt nhẹ lên đĩa thạch MH: Đầu tiên là đĩa thạch không có kháng sinh (để làm chứng), tiếp đến là các đĩa thạch đã có sẵn kháng sinh từ nồng độ thấp đến nồng độ cao, cuối cùng là đĩa thạch không có kháng sinh (để làm chứng). Khi đó, có khoảng 2 μ l huyền dịch vi khuẩn sẽ dính vào mỗi đầu chân đỉnh và nồng độ cuối cùng trên mặt thạch khoảng 10^4 vi khuẩn/1 vết chấm

- Kỹ thuật luôn được thực hiện cùng với chủng chuẩn để kiểm soát chất lượng: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

- Để các đĩa thạch ở nhiệt độ phòng/ 30 phút cho khô.

- Ủ ở 37⁰C trong vòng 18-24 giờ, đọc kết quả.

- Diễn giải kết quả:

+ Kiểm tra chất lượng: Tất cả các chủng mọc tốt ở 2 đĩa không chứa KS (đầu và cuối); giá trị MIC của các kháng sinh đối với 2 chủng *E. coli* ATCC 25922 và *P. aeruginosa* ATCC 27853 nằm trong khoảng giới hạn cho phép theo tiêu chuẩn của CLSI M100 S28 [131].

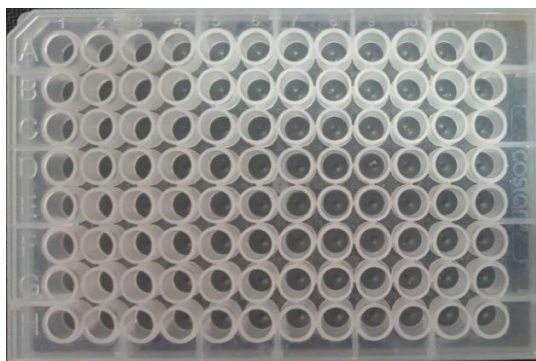
+ Đọc kết quả: Lần lượt đọc từ đĩa thạch có nồng độ KS thấp nhất. Giá trị MIC được xác định ở đĩa có nồng độ kháng sinh thấp nhất mà ở đó các vi

khuẩn bị ức chế phát triển (mật độ vi khuẩn giảm hẳn chỉ còn 1-3 khuẩn lạc mọc hoặc không còn khuẩn lạc nào). Ghi nhận kết quả: nhỏ hơn hoặc bằng nồng độ đó (\leq). Trong trường hợp đến nồng độ kháng sinh cao nhất mà vẫn thấy vi khuẩn mọc thì kết quả được ghi nhận là lớn hơn nồng độ đó ($>$).

Kết quả MIC của các chủng sẽ được phiên giải theo tiêu chuẩn của CLSI M100 S28 [131]: S (susceptible - nhạy cảm), I (intermediate - trung gian), R (resistant - đề kháng).

2.5.3.2. Kỹ thuật xác định MIC bằng phương pháp vi pha loãng trong môi trường lỏng (*Broth microdilution*)

Kỹ thuật xác định MIC của colistin được thực hiện trên đĩa 96 giếng (Microplate 96 well) tiêu chuẩn được khuyến cáo sử dụng cho thử nghiệm xác định MIC của colistin (Giếng có đáy tròn, được làm bằng polypropylene, chưa được xử lý (Not treated) - Corning® 3879 96-Well Round Bottom 330 μ L MicroPlate with Lid, Corner Notch, Clear Polypropylene, Not-Treated của hãng Corning, số sản phẩm: 3879) (Hình 2.3) [119]. [146].



Hình 2.3. Hình ảnh đĩa 96 giếng (Microplate 96 well)

Sử dụng bột kháng sinh colistin sulfate salt (hãng Sigma).

E. coli ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 và *E. coli* NCTC 13846 dương tính với gen *mcr1* (MIC của colistin là 4 μ g/ml) được sử dụng để kiểm tra chất lượng [147].

- Chuẩn bị kháng sinh colistin: với nồng độ pha loãng bậc 2 (từ 8 μ g/ml – 0,125 μ g/ml) trong môi trường canh thang Muller-Hinton broth. Có thể bảo quản kháng sinh đã pha ở -20 $^{\circ}$ C/1 tuần.

- Ria cấy các chủng chuẩn sử dụng để kiểm tra chất lượng và các chủng cần kiểm tra trên các đĩa thạch Mueller Hinton (Becton Dickinson, Mỹ), ủ ở 35-37°C trong 18-24 giờ.

- Chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn có độ đục tương đương với độ đục McFarland 0,5 (Khi đó huyền dịch có nồng độ khoảng $1-2 \times 10^8$ vi khuẩn/ml). Pha loãng 20 lần huyền dịch trên (lấy 250 μ l huyền dịch này cho vào 5 ml Muller-Hinton broth) để được huyền dịch có nồng độ khoảng 5×10^6 vi khuẩn/ml.

- Cho vào mỗi giếng của microplate 100 μ l kháng sinh (với các nồng độ pha loãng ở trên) và 10 μ l huyền dịch vi khuẩn (đã chuẩn bị ở trên). Khi đó nồng độ vi khuẩn ở mỗi giếng khoảng $4-5 \times 10^5$ vi khuẩn/ml.

- Ủ microplate ở 35-37°C/18-24 giờ.

- Đọc kết quả: MIC là nồng độ thấp nhất mà tại giếng đó không có vi khuẩn mọc (Không đục hoặc lắng cặn). Đọc các giếng của các chủng chứng trước, đạt yêu cầu về chất lượng khi MIC đối với chủng chứng *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 phải nằm trong khoảng giới hạn theo tiêu chuẩn của CLSI (0,25-2 μ g/ml) [131] và đối với chủng *E. coli* NCTC 13846: kết quả MIC nằm trong khoảng từ 2 - 8 μ g/ml và > 80% số thử nghiệm có MIC = 4 μ g/ml [147].

2.5.4. Kỹ thuật PCR phát hiện một số gen mã hóa carbapenemase lớp D và B ở *A. baumannii*

2.5.4.1. Tách chiết ADN của vi khuẩn

Sử dụng mẫu ADN được tách chiết ở mục 2.5.2.1

2.5.4.2. Kỹ thuật PCR

- Sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu cho từng loại gen đích (bảng 2.3).

- Sử dụng kỹ thuật PCR đa mồi để phát hiện các gen: *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-24-like}; Các phản ứng PCR đơn mồi để phát hiện các

gen: *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM} và trình tự chèn *ISAbal*, *ISAbal/bla*_{OXA-23-like}.

Chu trình nhiệt và các bước tiến hành đã được mô tả trong các nghiên cứu trước đây [22],[123],[124],[148],[149].

Bảng 2.3. Các đoạn môi đặc hiệu phát hiện gen kháng carbapenem

Gen được phát hiện	Môi	Trình tự môi (5' – 3')	Kích thước (bp)	Tài liệu tham khảo	
<i>bla</i> _{OXA-51-like}	OXA-51-F	taa tgc ttt gat cgg cct tg	353	Woodford, N et al, 2006 [124]	
	OXA-51-R	tgg att gca ctt cat ctt gg			
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	OXA-23-F	gat cgg att gga gaa cca ga	501		
	OXA-23-R	att tct gac cgc att tcc at			
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	OXA-58-F	aag tat tgg ggc ttg tgc tg	599		
	OXA-58-R	ccc ctc tgc gct cta cat ac			
<i>bla</i> _{OXA-24-like}	OXA-24-F	ggt tag ttg gcc ccc tta aa	246		
	OXA-24-R	agt tga gcg aaa agg gga tt			
<i>bla</i> _{NDM-1}	NDM-1-F	atgcacccggctgcgaagctgag	492		GenBank: FN396876.1 [22]
	NDM-1-R	ttcgaccagccattggcggcga			
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F	gga ata gag tgg cttaat tctc	232	Poirel et al, (2011) [123]	
	IMP-R	cca aac yac tas gtt atc t			
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F	gat ggt gtt tgg tcg cat a	390		
	VIM-R	cga atg cgc agc acc ag			
<i>bla</i> _{GIM}	GIM-F	tcg aca cac ctt ggt ctg aa	477		
	GIM-R	aac ttc caa ctt tgc cat gc			
<i>bla</i> _{SPM}	SPM-F	aaa atc tgg gta cgc aaa cg	271		
	SPM-R	aca tta tcc gctgga aca gg			
<i>bla</i> _{SIM}	SIM-F	tac aag gga ttc ggcatc g	570		
	SIM-R	taa tgg cct gtt ccc atg tg			
<i>ISAbal</i>	<i>ISAbal</i> F	cac gaa tgc aga agt tg	549	[148]	
	<i>ISAbal</i> R	cga cga ata cta tga cac			
<i>ISAbal/bla</i> _{OXA-23-like}	<i>ISAbal</i> F2	aac gat tgc gag cat c	1130	[149]	
	OXA-23 R2	gtc aac cag ccc act t			

* Phản ứng PCR đa môi để phát hiện các gen: *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-24-like}.

Thành phần phản ứng:

- + 25 µl 2X Go Taq Master Mix (Promega);
- + 1 µl hỗn hợp môi nồng độ 10 pmol;
- + 5 µl khuôn mẫu;
- + 19 µl nước siêu sạch.

Chu trình nhiệt của phản ứng: 94°C trong 5 phút; [94°C trong 25 giây, 52°C trong 40 giây, 72°C trong 50 giây] x 30 chu kỳ; 72°C trong 6 phút) [124].

* Phản ứng PCR đơn môi:

Thành phần phản ứng:

- + 25 µl 2X Go Taq Master Mix (Promega);
- + 0,4 µl môi nồng độ 10 pmol (02 µl môi xuôi, 0,2 µl môi ngược);
- + 5 µl ADN của mỗi mẫu;
- + 19,6 µl nước siêu sạch.

Chu trình nhiệt:

+ Chu trình nhiệt của PCR phát hiện *bla*_{NDM-1-like}: 94°C/5 phút; [94°C/36 giây, 60°C/36 giây, 72°C/50 giây] x 30 chu kỳ; 72°C/7 phút [22].

+ Chu trình nhiệt của PCR với các gen *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}: 94°C/5 phút; [94°C/30 giây, 52°C/40 giây, 72°C/50 giây] x 36 chu kỳ; 72°C/5 phút [123].

- Kiểm soát chất lượng phản ứng PCR bằng chứng dương và chứng âm. Đối với chứng âm, thay 5 µl ADN của mẫu bằng 5 µl nước cất hai lần. Chứng dương là ADN khuôn mẫu tách chiết từ các chủng vi khuẩn mang gen tương ứng do Viện Quốc gia các bệnh truyền nhiễm (NIID) Nhật Bản cung cấp (được lưu giữ tại phòng Kháng sinh – Khoa Vi khuẩn Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương).

- Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% trong TAE 1X (Invitrogen, Mỹ) rồi soi và chụp ảnh gel (UVP BioDoc-It ® Imaging Systems, Mỹ).

- Kết quả phản ứng PCR được xem là đạt yêu cầu khi chứng dương có 1 băng duy nhất, sáng rõ, đặc hiệu và đúng kích thước, chứng âm không có băng hiển thị.

- Phân tích kết quả: Xác định chủng vi khuẩn mang gen khi xuất hiện băng (band) có cùng kích thước với chứng dương tương ứng. Đại diện sản phẩm PCR có kích thước tương ứng với gen đích được giải trình tự gen. Sử dụng công cụ tìm kiếm trình tự tương đồng cơ bản – BLAST để đối chiếu với trình tự gen đích trên cơ sở dữ liệu của NCBI. Yêu cầu kết quả phải có độ tương đồng > 95%.

* Phản ứng PCR đơn môi phát hiện *ISAbal* và *ISAbal/bla_{OXA-23-like}*

Thành phần phản ứng:

- + 25 µl 2X Go Taq Master Mix (Promega);
- + 0,6 µl mỗi nồng độ 10 pmol (0,3 µl mỗi xuôi, 0,3 µl mỗi ngược);
- + 5µl ADN của mỗi mẫu;
- + 17,4 µl nước siêu sạch;
- + MgCl₂: 2 µl.

Chu trình nhiệt PCR phát hiện ISAbal: 95⁰C/5 phút; [95⁰C/30 giây, 56⁰C/45 giây, 72⁰C/45 giây] x 30 chu kỳ; 72⁰C/10 phút.

Chu trình nhiệt PCR phát hiện ISAbal/bla_{OXA-23-like}: 95⁰C/5 phút; [95⁰C/30 giây, 56⁰C/45 giây, 72⁰C/60 giây] x 30 chu kỳ; 72⁰C/10 phút.

Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% trong TAE 1X (Invitrogen, Mỹ), rồi soi và chụp ảnh gel (UVP BioDoc-It ® Imaging Systems, Mỹ).

Phân tích kết quả: Chủng vi khuẩn xuất hiện băng (band) có kích thước tương ứng với gen đích. Đại diện sản phẩm PCR được giải trình tự gen. Sử dụng công cụ tìm kiếm trình tự tương đồng cơ bản - BLAST để đối chiếu với trình tự gen đích trên cơ sở dữ liệu của NCBI. Yêu cầu kết quả phải có độ tương đồng > 95%.

Sử dụng ADN của chủng đã được xác định dương tính với IS*AbaI* và IS*AbaI/bla*_{OXA-23-like} (qua giải trình tự gen trên) làm chứng dương tương ứng.

2.5.5. Xác định kiểu gen của vi khuẩn bằng kỹ thuật điện di xung trường (Pulsed-field gel electrophoresis -PFGE)

Quy trình kỹ thuật được thực hiện theo hướng dẫn của Durmaz, R. Và CS [150].

2.5.5.1. Tách chiết ADN của vi khuẩn trong đệm thạch

- Lấy một khuẩn lạc của các chủng nghiên cứu và chủng chuẩn *Salmonella braenderup* H9812 trên đĩa thạch LB đã được nuôi cấy qua đêm ở 37°C cấy vào 5 ml môi trường LB lỏng, ủ ở 37°C trong 12-18 giờ. Ly tâm 8000 vòng x 5 phút loại dịch nổi, thu được cặn là các tế bào vi khuẩn.

- Hút 1 ml canh khuẩn vào tube 1,5 ml, ly tâm 8.000 vòng/phút x 5 phút.

- Loại bỏ dịch nổi, rửa cặn bằng dung dịch đệm TE 1X, sau đó ly tâm 8.000 vòng/phút trong 5 phút.

- Loại bỏ dịch nổi rồi bổ sung 400 µl đệm tạo huyền dịch tế bào (100 mM Tris pH = 8,0, 100 mM EDTA pH = 8,0) và 20 µl proteinase K (20 mg/ml) (Sigma, Mỹ). Trộn nhẹ bằng pipet.

- Bổ sung 400 µl SeaKem Gold (Lonza, Ý) 1% vào huyền dịch vi khuẩn, trộn đều, sau đó nhỏ hỗn dịch vào khuôn tạo miếng thạch, để ở nhiệt độ phòng khoảng 10-15 phút cho thạch đông lại.

- Chuyển các miếng thạch chứa vi khuẩn sang tuýp mới chứa 5 ml đệm ly giải tế bào (50 mM Tris; 50 mM EDTA pH = 8,0; 1% sarcosine) và 30 µl proteinase K (20 mg/ml).

- Ủ lắc nhẹ trong bể ủ nhiệt ở 55°C trong 2-4 giờ.

- Loại bỏ đệm ly giải tế bào, rửa miếng thạch bằng 15 ml nước khử ion vô trùng x 2 lần, mỗi lần 15 phút ở 50-55°C. Lặp lại bước rửa 4 lần với đệm TE 1X.

- Chuyển miếng thạch sang tube mới chứa đệm TE 1X và bảo quản ở 2-6°C cho tới khi sử dụng.

2.5.5.2. Cắt ADN vi khuẩn bằng enzyme giới hạn *AbaI*

- Sử dụng enzyme giới hạn *AbaI* (Roche Diagnostis, Mannheim, Đức) để cắt ADN chromosome của vi khuẩn trong miếng thạch pluge với nồng độ 30U/miếng thạch. Ủ ở 37°C trong 4 giờ.

- Cắt và nhồi các miếng thạch plug vào giếng của bản thạch SeaKem Gold 1%.

- Điện di bản thạch trong đệm TBE 0,5X (Invitrogen, Mỹ) bằng bộ điện di CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif) ở điều kiện: Hiệu điện thế 6V/cm², góc điện trường là 120 độ, thời gian một xung từ 5 đến 30 giây, trong tổng thời gian là 20 giờ ở nhiệt độ 14°C [150].

- Sau khi điện di, bản thạch sẽ được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide và chụp ảnh, các băng ADN của các chủng vi khuẩn sẽ được so sánh với nhau và với chủng chuẩn *Salmonella braenderup* H9812 được chạy song song để làm thang chuẩn.

- Kết quả sau đó được phân tích bằng phần mềm Bionumeric 6.0 (Applied Math) để tạo cây phả hệ. Các chủng sẽ được xem là thuộc cùng 1 cụm (cluster) nếu có độ tương đồng từ 80% trở lên [151].

2.5.6. Một số thử nghiệm phát hiện sinh carbapenemase ở *A. baumannii*

Các chủng *A. baumannii* được đánh giá khả năng sinh carbapenemase bằng các thử nghiệm Modified Hodge test (MHT), Triton Hodge Test (THT), CarbAcineto NP, CarbAcineto NP cải tiến và CIM.

Tiêu chuẩn xác định một chủng sinh carbapenemase khi có một trong các thử nghiệm sinh carbapenemase dương tính.

2.5.6.1. Kỹ thuật MHT [143]

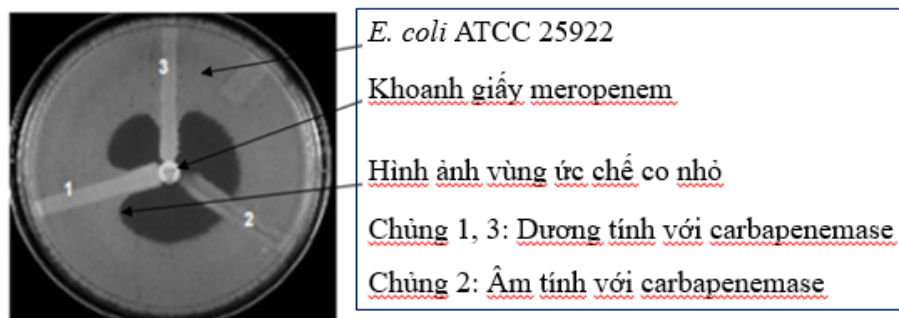
Huyền dịch *E. coli* ATCC 25922 trong NaCl 0,9% có độ đục tương đương McFaland 0,5. Pha loãng huyền dịch trên với tỷ lệ 1/10 trong NaCl 0,9%.

Dàn đều huyền dịch lên bề mặt môi trường thạch Muller-Hinton (MHA), để khô tự nhiên trong 3-5 phút.

Đặt khoanh giấy meropenem 10 µg lên giữa bề mặt MHA.

Sử dụng đầu que cấy 10 µl lấy khuẩn lạc chủng vi khuẩn cần thử nghiệm (Được nuôi cấy qua đêm trên môi trường LB), vạch một đường thẳng từ mép của khoanh giấy (chiều dài đường cấy ít nhất là 20-25mm).

Ủ ở 35-37⁰C/18-24 giờ.



Hình 2.4. Hình ảnh kỹ thuật MHT [129]

Đọc kết quả: Nếu chủng thử nghiệm sinh carbapenemase sẽ bất hoạt meropenem trong môi trường, khi đó sẽ không đủ lượng meropenem để ức chế *E.coli* ATCC, quan sát thấy vùng ức chế nơi giao thoa với đường cấy chủng thử nghiệm thu nhỏ giống như hình nan quạt (Hình 2.4).

2.5.6.2. Kỹ thuật THT

Nhỏ 50 µl Triton X-100 tinh khiết vào giữa đĩa MHA, rồi nhanh chóng dùng que thủy tinh phân tán đều Triton trên toàn bộ bề mặt thạch, bảo quản đĩa thạch ở 2-8⁰C đến khi sử dụng [133].

Trước khi sử dụng, để đĩa thạch vào tủ ấm 35-37⁰C/10 phút để độ ẩm trên bề mặt môi trường bốc hơi. Sau đó, thực hiện các bước như với kỹ thuật MHT (như mô tả ở mục 2.5.6.1).

2.5.6.3. Kỹ thuật CarbAcineto NP

Kỹ thuật được thực hiện một phần theo kỹ thuật Carba NP - hướng dẫn của CLSI năm 2018 [131], CarbAcineto NP của Dortet và CS [14] và CarbAcineto NP cải tiến [144].

**Chuẩn bị:*

+ Dung dịch Carba NP A: 2 ml đỏ phenol 0,5% và 16,6ml nước khử ion, 180µl kẽm sulfat 10mM. Chính pH $7,8 \pm 0,1$ bằng NaOH 0,1N hoặc HCl 10% (Bảo quản ở $4-8^{\circ}\text{C}/2$ tuần, trong lọ màu tối tránh ánh sáng) [131].

+ Dung dịch Carba NP B: Cứ 1ml dung dịch Carba NP A cộng thêm 6 mg imipenem monohydrate (Của USP) và bảo quản ở $4-8^{\circ}\text{C}/3$ ngày.

+ Sử dụng dung dịch ly giải vi khuẩn NaCl 5M [14] để hạn chế tác động đệm của Tris-HCl pH 7,4 như đối với thử nghiệm Carba NP [141].

+ Chủng *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 (chứng dương), *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 (chứng âm) và chủng vi khuẩn cần kiểm tra: Được nuôi cấy trên môi trường thạch LB hoặc các môi trường không có chất ức chế ở $37^{\circ}\text{C}/18-24$ giờ.

** Tiến hành:*

Cho đầy 1 vòng que cấy 10 µl chủng vi khuẩn cần kiểm tra vào 2 ống eppendorf (A, B) chứa 100 µl dung dịch NaCl 5M, vortex 5 giây.

Cho 100µl dung dịch Carba NP A vào ống A (Chứng nội), cho 100µl dung dịch Carba NP B vào ống B.

Vortex 30 giây, ủ ở $35-37^{\circ}\text{C}$ tối đa trong vòng 2 giờ.

** Kiểm tra chất lượng:*

Ống A (Chứng nội): Phải có màu đỏ. Nếu có bất kỳ màu nào khác thì thử nghiệm đều không có giá trị (Hình 2.5).

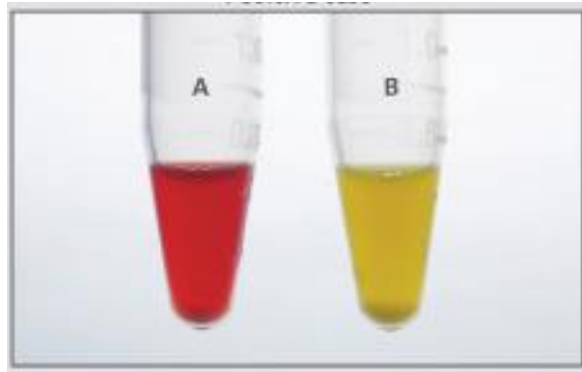
Ống được thử với *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 (chứng dương): Phải có màu vàng (Hình 2.5).

Ống được thử với *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 (chứng âm): Phải có màu đỏ.

**Đọc kết quả (Hình 2.5)*

Ống B: + Màu đỏ: Âm tính;

+ Màu vàng hoặc cam: Dương tính.



Hình 2.5: Hình ảnh thử nghiệm CarbaNP [131]

Chú thích: Ống A: phản ứng dương tính; Ống B: Phản ứng âm tính

2.5.6.4. Kỹ thuật CarbAcineto NP cải tiến

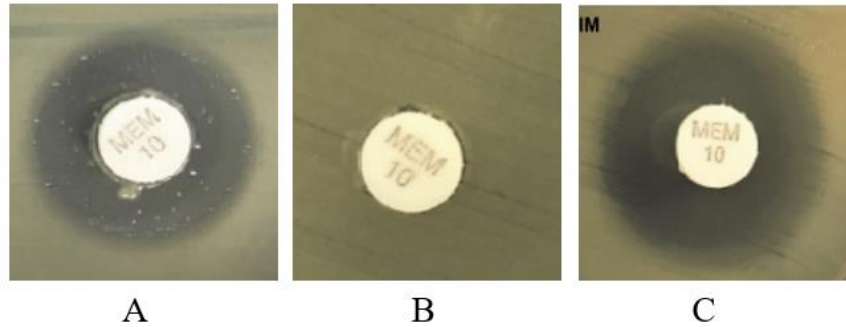
Được tiến hành như với thử nghiệm CarbAcineto NP chỉ có thay đổi đối với dung dịch Carba NP B: Cứ 1ml dung dịch Carba NP A cộng thêm 26,9 mg bột thuốc Tienam tiêm (Của Merck) tương đương khoảng 12 mg imipenem-cilastatin thay cho bột imipenem monohydrate [144].

2.5.6.5. Kỹ thuật bất hoạt carbapenem (Carbapenem Inactivation Method -CIM)

Kỹ thuật được thực hiện theo kỹ thuật mCIM - hướng dẫn của CLSI năm 2018 [131], có thay đổi: 2 ml TSB bằng 400 μ l môi trường canh thang MH.

Dùng que cấy loại 10 μ l, lấy đầy 1 vòng que cấy khuẩn lạc của chủng vi khuẩn cần kiểm tra (được nuôi cấy qua đêm trên môi trường MHA), cho vào ống tube chứa 400 μ l môi trường MH canh thang, vortex 10-15 giây, tiếp theo cho khoanh giấy meropenem 10 μ g vào, ủ ở 35⁰C trong 4 giờ.

Sau khi ủ, lấy khoanh KS ra khỏi huyền dịch trên (lưu ý: ép bỏ bớt huyền dịch thấm vào khoanh giấy), đặt khoanh giấy KS đó lên trên bề mặt của môi trường MHA đã được ria cấy với huyền dịch *E. coli* ATCC 29522 (có độ đục tương đương 0,5 McFaland), để 15 phút ở nhiệt độ phòng và sau đó ủ ở 35°C trong 18-24 giờ.



Hình 2.6. Hình ảnh kết quả của kỹ thuật CIM [131].

Đọc kết quả (Theo hướng dẫn của CLSI [131]):

- Carbapenemase dương tính: khi vùng ức chế từ 6–15 mm (Hình 2.6.A) hoặc có mặt của các khuẩn lạc trong vùng 16-18 mm (Hình 2.6.B)
- Carbapenemase âm tính: Khi vùng ức chế ≥ 19 mm (Hình 2.6.C)
- Không xác định được carbapenemase dương/ âm tính: Nếu vùng ức chế có đường kính 16-18 mm. Cần kiểm tra lại chất lượng kỹ thuật và lặp lại kỹ thuật CIM cho các chủng thử nghiệm và chủng QC.

Kiểm tra chất lượng kỹ thuật với chủng: *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 (chứng dương) và *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 (chứng âm).

2.6. XỬ LÝ VÀ PHÂN TÍCH SỐ LIỆU

Số liệu được quản lý bằng phần mềm Excel. Tính tỷ lệ (%) và kiểm định Khi bình phương hoặc Fisher's exact test được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa các tỷ lệ. Kết quả được thể hiện qua các bảng và biểu đồ.

Phần mềm Bio-Numeric 6.6 (Applied Math) được sử dụng để phân tích mối liên hệ về kiểu gen PFGE của các chủng *A. baumannii*. Các kết quả được trình bày dưới dạng cây phá hệ.

2.7. ĐẠO ĐỨC NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu này là thử nghiệm trong phòng thí nghiệm, không can thiệp vào quá trình điều trị, không ảnh hưởng đến kết quả điều trị và tâm lý người bệnh.

Chỉ sử dụng các thông tin vào mục đích nghiên cứu.

Nghiên cứu đã được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Trường Đại học Y Hà Nội (mã số IRB00003121 được cấp bởi Bộ Y tế và Dịch vụ nhân sinh Hoa Kỳ, ngày 16 tháng 6 năm 2009 được cấp lại ngày 18 tháng 02 năm 2016) thông qua theo Chấp thuận số 187/HĐĐĐĐHYHN ngày 20 tháng 02 năm 2016.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. XÁC ĐỊNH NỒNG ĐỘ ỨC CHẾ TỐI THIỂU (MIC) CỦA CARBAPENEM VỚI CÁC CHỦNG *A. BAUMANNII*

3.1.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Bảng 3.1. Phân bố chủng nghiên cứu theo bệnh viện và vùng miền

TT	Vùng miền	Bệnh viện	Số lượng	Tỷ lệ (%)
1	Miền bắc (n = 67)	Trung ương Quân đội 108	15	10,4
		Xanh Pôn	17	11,8
		Thanh Nhân	22	15,3
		Bắc Giang	13	9,0
2	Miền Trung (n = 48)	Trung ương Huế	23	16,0
		Đa khoa Nghệ An	10	6,9
		Đa khoa Hà Tĩnh	15	10,4
3	Miền Nam (n = 29)	Chợ Rẫy	14	9,7
		Nhi Đồng 1	15	10,4
Tổng			144	100

144 chủng *A. baumannii* được thu thập trên bệnh nhân từ 9 bệnh viện thuộc 3 miền của Việt Nam. 4 bệnh viện ở miền Bắc có số mẫu nhiều nhất (46,6%), tiếp đến là 3 bệnh viện ở miền Trung (33,3%), 2 bệnh viện ở miền Nam (20,1%).

Bảng 3.2. Phân bố số chủng nghiên cứu theo loại mẫu bệnh phẩm

TT	Loại mẫu bệnh phẩm	Số lượng	Tỷ lệ (%)
1	Dịch tiết đường hô hấp	113	78,5
2	Ngoài da và mô mềm	19	13,2
3	Máu	8	5,5
4	Nước tiểu	4	2,8
	Tổng	144	100

Trong 144 chủng nghiên cứu, tỷ lệ mẫu bệnh phẩm dịch tiết đường hô hấp là chủ yếu (78,5%), tiếp đến là mẫu bệnh phẩm ngoài da và mô mềm, mẫu bệnh phẩm máu và nước tiểu chiếm tỷ lệ thấp hơn hẳn.

3.1.2. Xác định MIC của carbapenem với các chủng *A. baumannii*

Bảng 3.3. Tỷ lệ *A. baumannii* đề kháng với carbapenem

	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Nhạy cảm với carbapenem	24	16,7
Đề kháng với carbapenem	120	83,3
Tổng	144	100

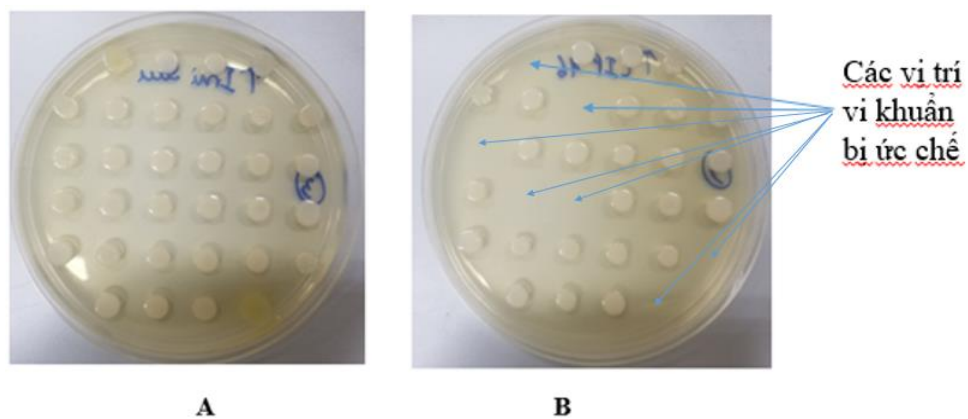
Chú thích: Kháng sinh carbapenem thử nghiệm gồm: IPM, MEM, DOR

144 chủng nghiên cứu, có 120 chủng (83,3%) đề kháng với carbapenem và 24 chủng (16,7%) nhạy cảm với carbapenem. Tất cả các chủng khi nhạy cảm hoặc đề kháng với 1 loại carbapenem thì cũng nhạy cảm hoặc đề kháng với cả 3 loại carbapenem thử nghiệm.

Bảng 3.4. Giá trị MIC của kháng sinh với các chủng *A. baumannii*

Kháng sinh	Dải MIC ($\mu\text{g/ml}$) (n=144)	Điểm gãy ($\mu\text{g/ml}$)		MIC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) (n=144)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$) (n=144)	Tỷ lệ (%)		
		S	R			R	I	S
Imipenem	0,025 ->64	≤ 2	≥ 8	64	>64	83,3	0	16,7
Meropenem	0,06 - 64	≤ 2	≥ 8	32	64	83,3	0	16,7
Doripenem	0,015 ->64	≤ 2	≥ 8	32	64	83,3	0	16,7
Ceftazidime	8 - >128	≤ 8	≥ 32	128	>128	85,4	1,4	13,2
Cefepime	2 - >128	≤ 8	≥ 32	128	>128	84,0	1,4	14,6
Amikacin	0,5 ->256	≤ 16	≥ 64	>256	>256	70,8	7,6	21,6
Levofloxacin	0,06 ->64	≤ 2	≥ 8	64	>64	83,3	4,2	12,5
Minocycline	0,25 - 32	≤ 4	≥ 16	2	16	21,5	13,2	65,3
Colistin	<0,25 -1	≤ 2	≥ 4	0,25	0,5	00	-	100

7/9 kháng sinh đã bị kháng $\geq 70,8\%$ (trong đó 6 KS đã bị kháng $\geq 83,3\%$) và MIC₅₀, MIC₉₀ rất cao; tỷ lệ kháng với minocyclin thấp nhất trong các KS thử nghiệm (trừ KS colistin chưa thấy chủng nào đề kháng). Dải giá trị MIC của colistin từ < 0,25 – 1 $\mu\text{g/ml}$, MIC₅₀ = 0,25 $\mu\text{g/ml}$, MIC₉₀ = 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

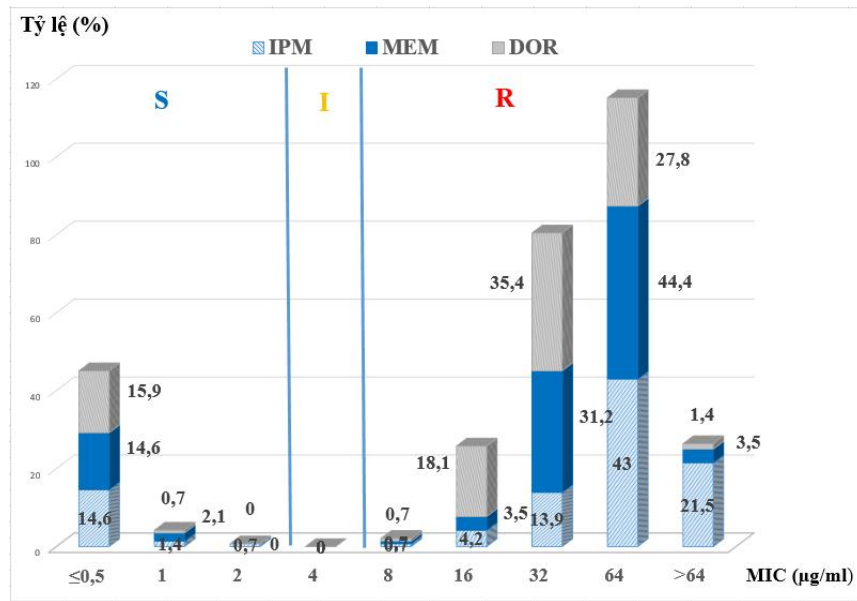
**Hình 3.1. Hình ảnh cho kỹ thuật xác định MIC pha loãng trong thạch**

Hình 3.1A. Hình ảnh 32 chủng cần kiểm tra MIC trên đĩa môi trường không có KS
 Hình 3.1.B. Đã có những chủng bị ức chế ở đĩa môi trường có KS. Giá trị MIC được xác định ở đĩa có nồng độ KS thấp nhất mà ở đó các VK bị ức chế phát triển (mật độ vi khuẩn giảm hẳn chỉ còn 1-3 khuẩn lạc mọc hoặc không còn khuẩn lạc nào).

Bảng 3.5. Mức độ đề kháng của chủng nghiên cứu theo vùng miền

Kháng sinh	Vùng miền	Dải MIC μg/ml (n=144)	MIC ₅₀ μg/ml (n=144)	MIC ₉₀ μg/ml (n=144)	Tỷ lệ kháng (%)
Imipenem	Miền Bắc	0,025 - >64	64	>64	88,1
	Miền Trung	0,025 - >64	64	>64	81,2
	Miền Nam	0,025 - >64	64	>64	75,9
Meropenem	Miền Bắc	0,06 - >64	32	64	88,1
	Miền Trung	0,06 - >64	32	64	81,2
	Miền Nam	0,06 - >64	32	64	75,9
Doripenem	Miền Bắc	0,015 - >64	32	64	88,1
	Miền Trung	0,015 - >64	32	64	81,2
	Miền Nam	0,015 - >64	32	64	75,9
Ceftazidime	Miền Bắc	8 - >128	128	>128	91,0
	Miền Trung	8 - >128	128	>128	83,3
	Miền Nam	8 - >128	128	>128	75,9
Cefepime	Miền Bắc	2 - >128	128	>128	89,6
	Miền Trung	2 - >128	128	>128	81,2
	Miền Nam	2 - >128	128	>128	75,9
Amikacin	Miền Bắc	0,5 - >256	>256	>256	74,6
	Miền Trung	0,5 - >256	>256	>256	70,8
	Miền Nam	0,5 - >256	>256	>256	62,1
Levofloxacin	Miền Bắc	0,06 - >64	64	>64	89,6
	Miền Trung	0,06 - >64	64	>64	79,2
	Miền Nam	0,06 - >64	64	>64	75,9
Minocycline	Miền Bắc	0,25 – 32	2	16	23,9
	Miền Trung	0,25 – 32	2	16	18,8
	Miền Nam	0,25 – 32	2	16	20,7
Colistin	Miền Bắc	<0,25 – 1	0,25	0,5	00
	Miền Trung	<0,25 – 1	0,25	0,5	00
	Miền Nam	<0,25 – 1	0,25	0,5	00

Tỷ lệ đề kháng KS của các chủng *A. baumannii* ở 3 miền không hoàn toàn như nhau. Nhưng dải giá trị MIC, MIC₅₀, MIC₉₀ của các KS ở 3 miền không có sự khác biệt.



Biểu đồ 3.1. Phân bố tỷ lệ (%) giá trị MIC của carbapenem đối với các chủng *A. baumannii*

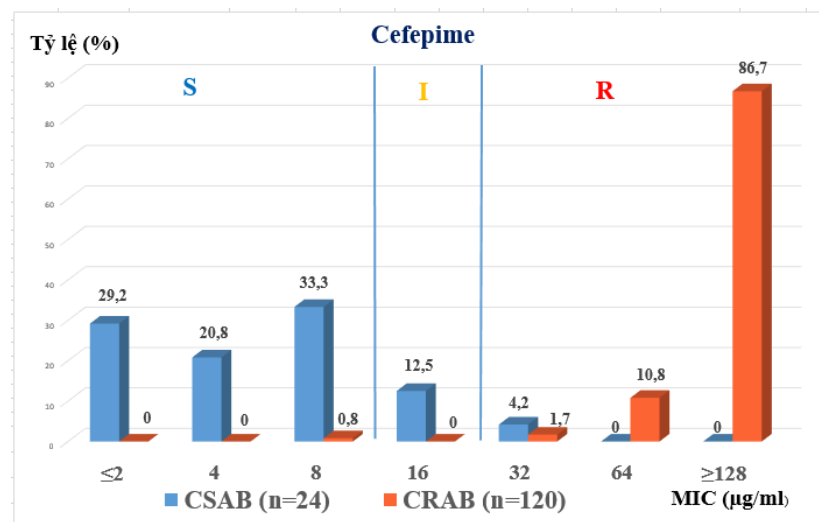
Giá trị MIC = 32 - 64 µg/ml chiếm tỷ lệ nhiều nhất. DOR có MIC thấp hơn so với IPM và MEM, tỷ lệ DOR có MIC ≥ 64 µg/ml là 29,2% so với 64,5% và 47,9% của IPM và MEM (sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$). Đối với các chủng CSAB, MIC ≤ 0,5 µg/ml là chủ yếu.

Bảng 3.6. Giá trị MIC của một số kháng sinh ở 2 nhóm CSAB và CRAB

Loại KS	Dải MIC (µg/ml)		MIC ₅₀ (µg/ml)		MIC ₉₀ (µg/ml)		Tỷ lệ (%) kháng	
	CSAB n=24	CRAB n=120	CSAB n=24	CRAB n=120	CSAB n=24	CRAB n=120	CSAB n=24	CRAB n=120
CAZ	4 - 128	8 - >128	8	>128	128	>128	16,7	99,2
	$<0,001$							
CPM	2 - 32	16 - >128	4	128	16	>128	8,3	99,2
	$<0,001$							

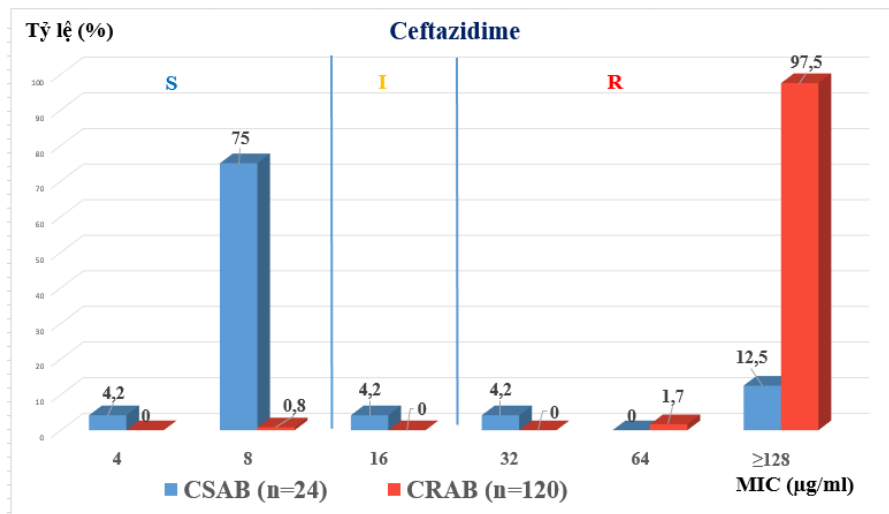
AK	0,5 - >256	1 - >256	1	>256	32	>256	8,3	83,3
							<0,001	
LEV	0,06 - 16	0,125 - 64	2	>64	16	>64	29,2	94,2
							<0,001	
MI	0,125 - 32	0,25 - 32	0,5	2	8	32	8,3	24,2
							<0,05	
CO	<0,25– 0,5	<0,25 - 1	0,25	0,25	0,5	0,5	0	0

Giá trị MIC₅₀, MIC₉₀ và tỷ lệ đề kháng với một số KS (Ngoại trừ colistin và minocyclin) ở nhóm chủng CSAB thấp hơn hẳn so với nhóm CRAB (sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$).



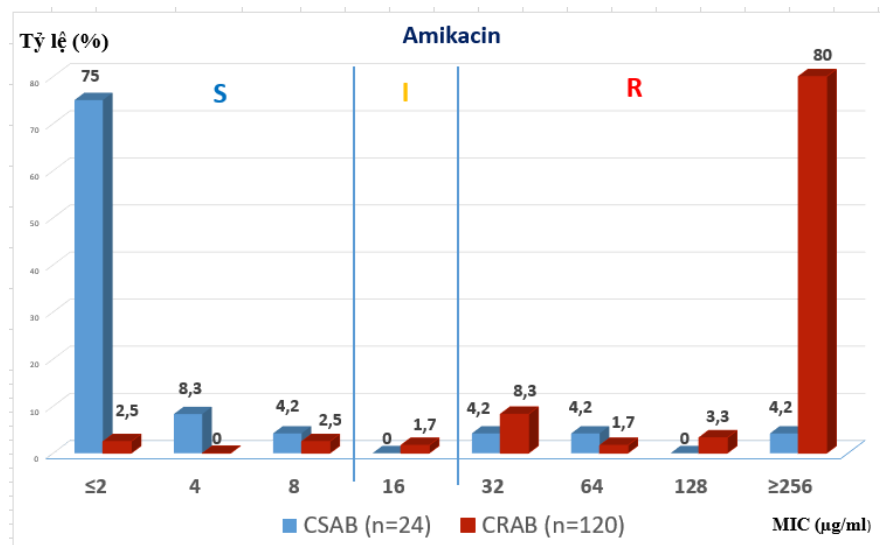
Biểu đồ 3.2. Phân bố tỷ lệ (%) giá trị MIC của cefepime ở 2 nhóm CSAB và CRAB

Đối với các chủng CSAB, 83,3% số chủng có MIC ≤ 8 µg/ml (còn nhạy cảm với CPM). Đối với các chủng CRAB, 99,2% số chủng đề kháng với CPM và 86,7% số chủng có MIC ≥ 128 µg/ml.



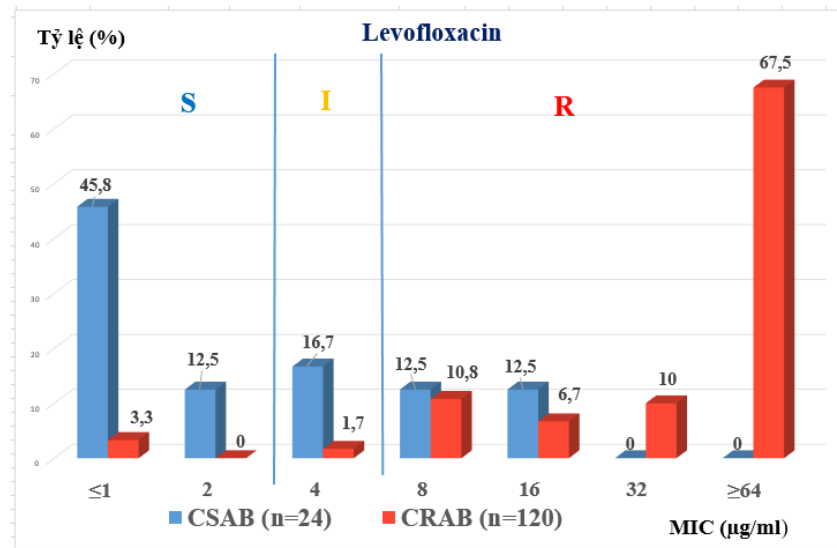
Biểu đồ 3.3. Phân bố tỷ lệ (%) giá trị MIC của ceftazidime ở 2 nhóm CSAB và CRAB

Đối với các chủng CSAB, 79,2% số chủng có MIC ≤ 8 µg/ml (còn nhạy cảm với CAZ). Đối với các chủng CRAB, 99,2% số chủng đề kháng với CPM và 97,5% số chủng có MIC ≥ 128 µg/ml.



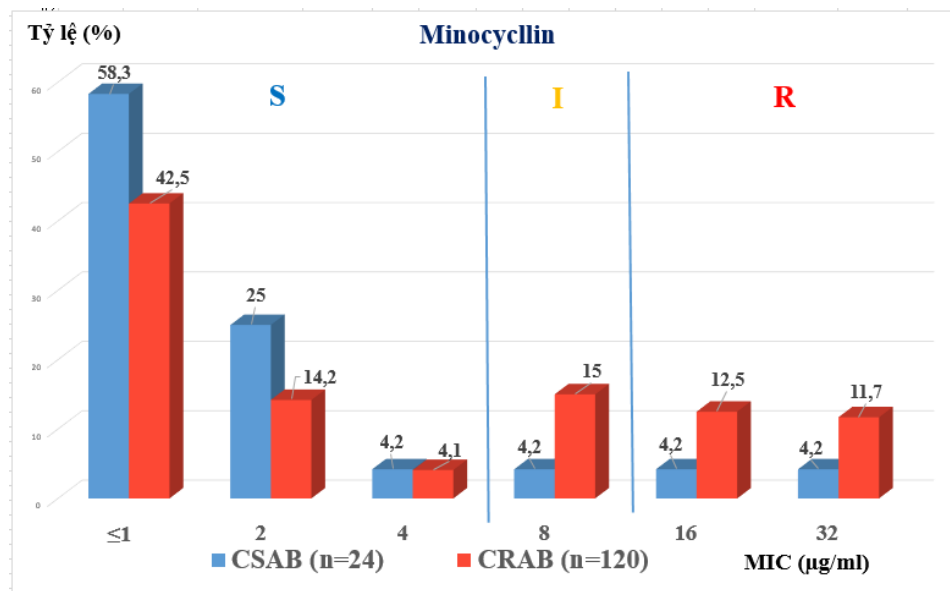
Biểu đồ 3.4. Phân bố tỷ lệ (%) giá trị MIC của amikacin ở 2 nhóm CSAB và CRAB

Đối với các chủng CSAB, 83,3% số chủng có MIC ≤ 16 µg/ml (nhạy cảm với AK), trong đó MIC ≤ 2 µg/ml là chủ yếu (70,8%). Đối với các chủng CRAB, 85,0% số chủng cũng đề kháng với AK và 80,0% số chủng có MIC ≥ 256 µg/ml.



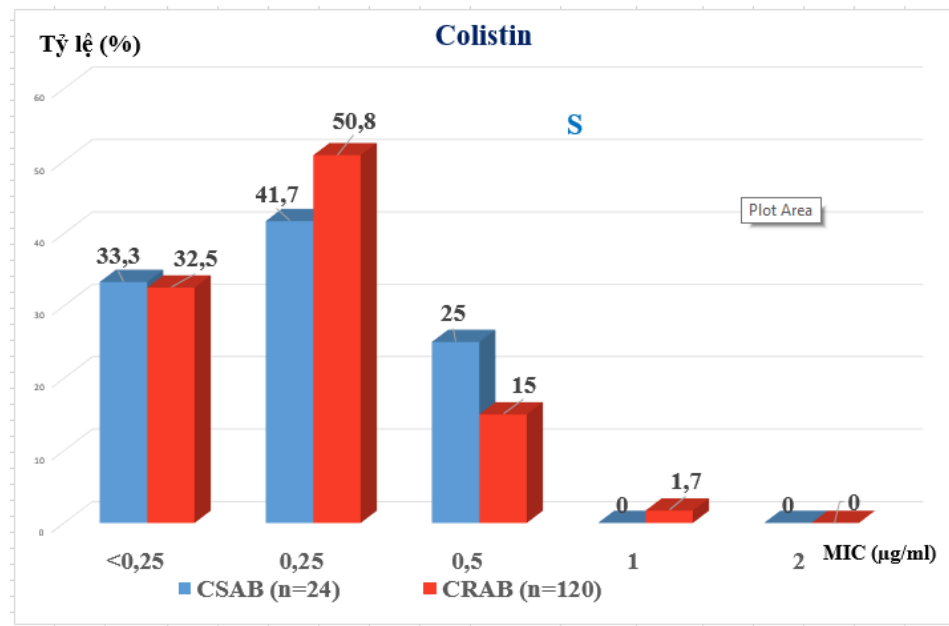
Biểu đồ 3.5. Phân bố tỷ lệ (%) giá trị MIC của levofloxacin ở 2 nhóm CSAB và CRAB

Đối với các chủng CSAB, 58,3% số chủng có MIC ≤ 2 µg/ml (nhạy cảm với LEV), MIC ≤ 1 µg/ml là 45,8%. Đối với các chủng CRAB, 95,0% số chủng đề kháng với LEV và 67,5% số chủng có MIC ≥ 64 µg/ml.



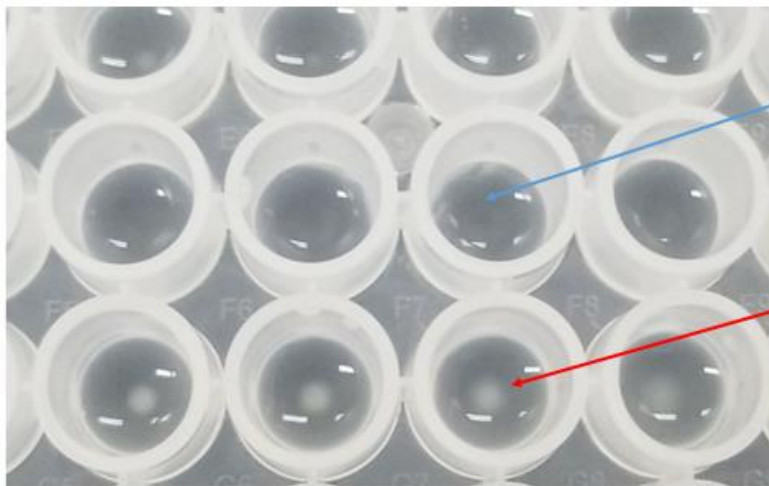
Biểu đồ 3.6. Phân bố tỷ lệ (%) giá trị MIC của minocyclin ở 2 nhóm CSAB và CRAB

Đối với cả 2 nhóm CSAB và CRAB, tỷ lệ chủng nhạy cảm với MI còn khá cao (87,5% và 60,8%) (Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$). MIC ≤ 1 µg/ml là 58,3% và 42,5% ở 2 nhóm.



Biểu đồ 3.7. Phân bố tỷ lệ (%) giá trị MIC của colistin ở 2 nhóm CSAB và CRAB

Đối với cả 2 nhóm CSAB và CRAB, 100% số chủng còn nhạy cảm với colistin và không có sự khác biệt về phân bố giá giá trị MIC giữa 2 nhóm. Gần 1/2 số chủng có MIC = 0,25 µg/ml.



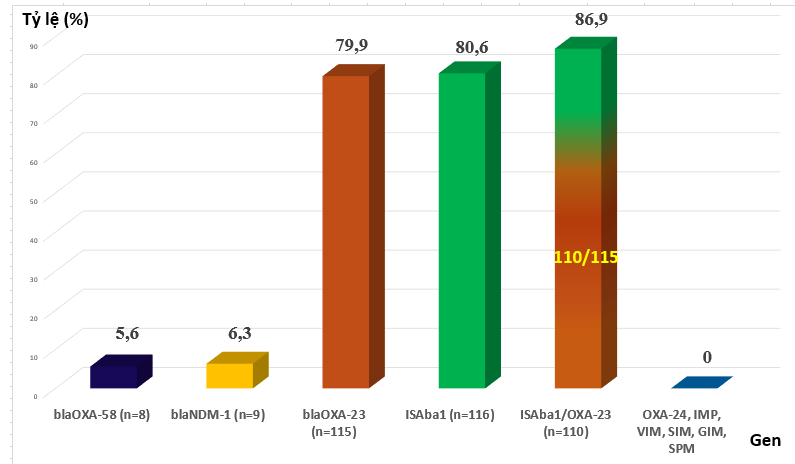
Giếng ở đó Vi khuẩn đã bị ức chế

Giếng ở đó vi khuẩn chưa bị ức chế

Hình 3.2. Hình ảnh kỹ thuật xác định MIC đối với colistin

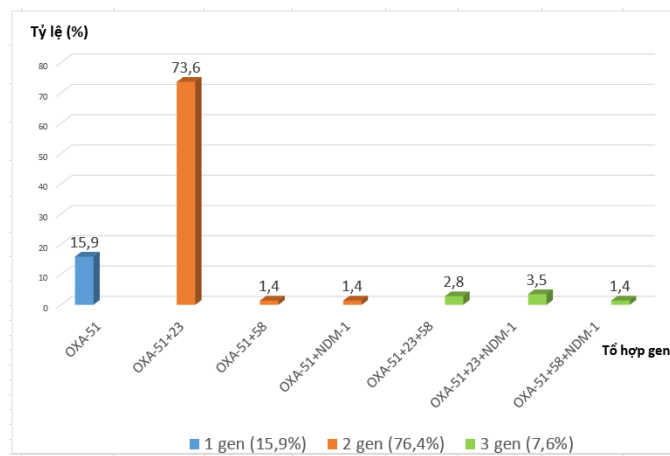
3.2. PHÁT HIỆN MỘT SỐ GEN MÃ HÓA CARBAPENEMASE LỚP D, B CỦA *ACINETOBACTER BAUMANNII*

3.2.1. PCR phát hiện một số gen mã hóa carbapenemase



Biểu đồ 3.8. Tỷ lệ gen mã hóa carbapenemase phát hiện được ở các chủng *A. baumannii*

Trong 144 chủng *A. baumannii*, 79,9% mang gen *bla*_{OXA-23-like}, gen *bla*_{OXA-58-like} và *bla*_{NDM-1} chiếm tỷ lệ thấp (5,6% và 6,3%), 80,6% có *ISAbal* và 86,9% (110/115) số chủng mang gen *bla*_{OXA-23-like} có *ISAbal* ở vùng trước của gen *bla*_{OXA-23-like} (*ISAbal/bla*_{OXA-23-like}). Không xác định được chủng nào mang gen *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}.



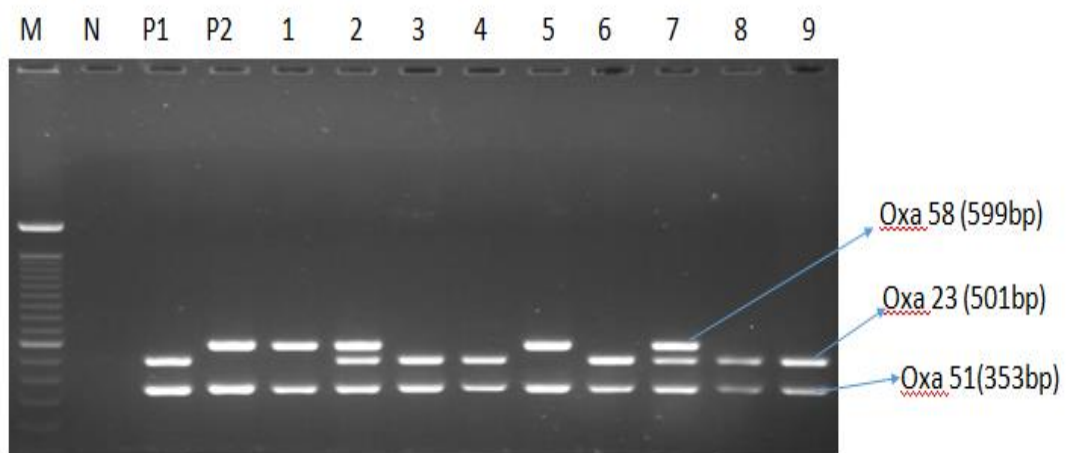
Biểu đồ 3.9. Tỷ lệ tổ hợp các gen mã hóa carbapenemase ở các chủng *A. baumannii*

Trong số 144 chủng, chỉ có 15,9% số chủng dương tính với duy nhất gen *bla*_{OXA-51-like}. Trong khi đó, 76,4% số chủng mang hai gen (nhiều nhất là tổ hợp *bla*_{OXA-51-like}+*bla*_{OXA-23-like}); 7,6% số chủng mang tổ hợp 3 gen mã hóa carbapenemase.

Bảng 3.7. Tỷ lệ các chủng *A. baumannii* dương tính với IS*Aba1*

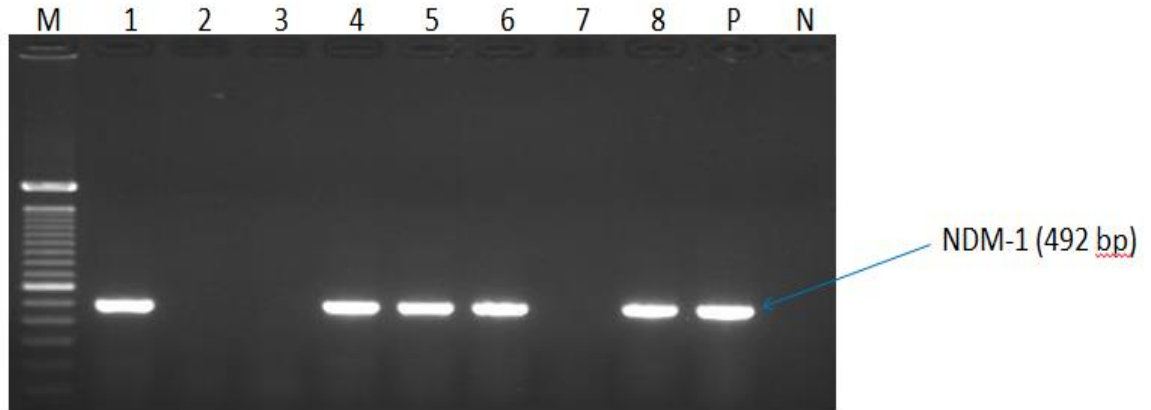
	IS <i>Aba1</i> dương tính (n=116)		
	Chủng chỉ có <i>bla</i> _{OXA-51-like}	Chủng có <i>bla</i> _{OXA-23-like}	Chủng không có <i>bla</i> _{OXA-23-like}
Số chủng dương tính/tổng	6/23	110/115	0/6
Tỷ lệ (%)	26,1	95,7	0

Trong 116 chủng dương tính với IS*Aba1*, 26,1% số chủng chỉ mang *bla*_{OXA-51-like} và 95,7% các chủng có *bla*_{OXA-23-like} dương tính với IS*Aba1*, các chủng không có *bla*_{OXA-23-like} không dương tính với IS*Aba1*.



Hình 3.3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR đoạn gen *bla*_{OXA} của các chủng *A. baumannii*

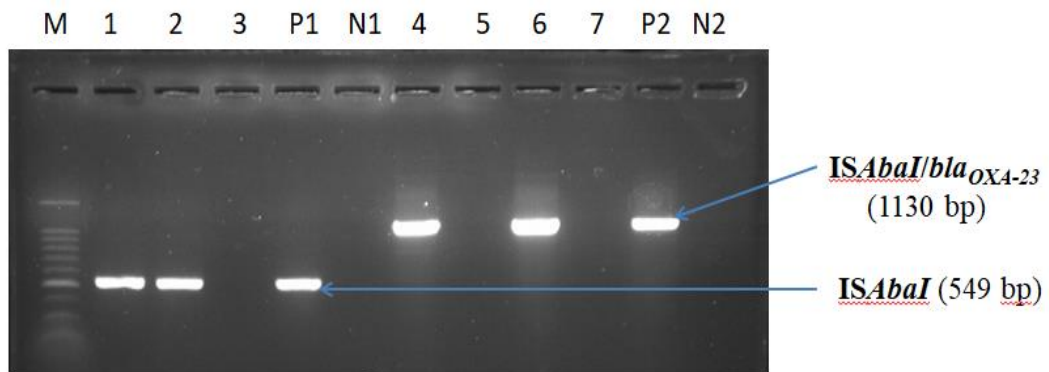
Chú thích: Giếng 1-9: Kết quả đại diện phát hiện gen *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-58-like} của các chủng *A. baumannii* nghiên cứu. P1: Chủng dương 1- ADN mang gen *bla*_{OXA-51-like} *bla*_{OXA-23-like}, P2: Chủng dương 2- ADN mang gen *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58} của *A. baumannii*; N: chứng âm; M: thang chuẩn 100bp.



Hình 3.4. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR đoạn gen bla_{NDM-1} của các chủng *A. baumannii*

*Chú thích: P: Chứng dương - DNA mang gen bla_{NDM-1} của *A. baumannii*.*

N: chứng âm; M: thang chuẩn (100bp). Mẫu 1,4,5,6,8: Dương tính với gen bla_{NDM-1} .



Hình 3.5. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR đoạn gen $ISAbal$ và $ISAbal/bla_{OXA-23}$ của các chủng *A. baumannii*

Chú thích: P1: Chứng dương - DNA mang gen $ISAbal$. P2: Chứng dương - DNA mang gen $ISAbal/bla_{OXA-23}$. N1, N2: chứng âm; M: thang chuẩn (100bp).

Mẫu 1, 2: Dương tính với $ISAbal$; Mẫu 4,6: $ISAbal/bla_{OXA-23}$

Mẫu 5, 7: Dương tính với $ISAbal$; Mẫu 3, 8: $ISAbal/bla_{OXA-23}$

Acinetobacter baumannii strain 19-63P73 OXA-51 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-882 (blaOXA) gene, blaOXA-882 allele, complete cds

Sequence ID: [MN476922.1](#) Length: 922 Number of Matches: 1

Range 1: 284 to 636 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
652 bits(353)	0.0	353/353(100%)	0/353(0%)	Plus/Plus
Query 1	TAATGCTTTGATCGGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAGTGGGA	60		
Sbjct 284	TAATGCTTTGATCGGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAGTGGGA	343		
Query 61	TGGTaaaaaaaaGGTTATTTCCAGAATGGGAAAAGGACATGACCCTAGGCGATGCCATGAA	120		
Sbjct 344	TGGTAAAAAAGGTTATTTCCAGAATGGGAAAAGGACATGACCCTAGGCGATGCCATGAA	403		
Query 121	AGCTTCCGCTATTCCAGTTTATCAAGATTTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGTC	180		
Sbjct 404	AGCTTCCGCTATTCCAGTTTATCAAGATTTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGTC	463		
Query 181	TAAGGAAGTGAAGCGTGTTGGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAAGTCGATAATTT	240		
Sbjct 464	TAAGGAAGTGAAGCGTGTTGGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAAGTCGATAATTT	523		
Query 241	TTGGCTGGTGGGTCCTTTAAAAATTACTCCTCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAGCT	300		
Sbjct 524	TTGGCTGGTGGGTCCTTTAAAAATTACTCCTCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAGCT	583		
Query 301	AGCTAATAAAACGCTTCCATTTAGCCAAAAAGTCCAAGATGAAGTGAATCCA	353		
Sbjct 584	AGCTAATAAAACGCTTCCATTTAGCCAAAAAGTCCAAGATGAAGTGAATCCA	636		

Hình 3.6. Kết quả đại diện so sánh giải trình tự sản phẩm PCR gen *bla_{OXA-51-like}* với trình tự gen chuẩn

Kết quả PCR và giải trình tự sản phẩm PCR đối với gen *bla_{OXA-51-like}* của các chủng nghiên cứu như ở hình 3.4 và hình 3.7 (độ tương đồng 100% với trình tự gen *bla_{OXA-51-like}* trên cơ sở dữ liệu của NCBI) đã khẳng định gen *bla_{OXA-51-like}* phát hiện được trong nghiên cứu này là chính xác và đúng theo các tham chiếu quốc tế (kết quả giải trình tự được trình bày tại phụ lục 2).

Acinetobacter baumannii strain 6AB15 insertion sequence ISAb1, complete sequence; and OXA-23 carbapenemase (oxa-23) gene, complete cds

Sequence ID: [GQ849192.1](#) Length: 2036 Number of Matches: 1

Range 1: 781 to 1872 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match ▲](#)

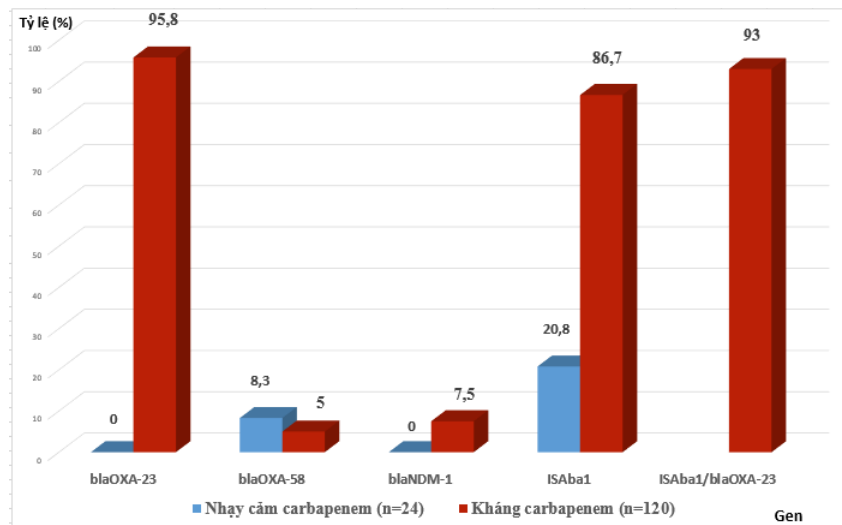
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1958 bits(1060)	0.0	1085/1096(99%)	6/1096(0%)	Plus/Plus
Query 15	ATTGCGAGCATCAGGATATTAATATTTTCGTTTTCCCATTTCCAATTGGTTCATCTAAA			74
Sbjct 781	ATTGCGAGCATCAGGATATTAATATTTTCGTTTTCCCATTTCCAATTGGTTCATCTAAA			840
Query 75	GTCAGTTGCACTTGGTTCGAATGAAAACATATTGAAAATCAACTGAGAAA-TTGACGATAA			133
Sbjct 841	GTCAGTTGCACTTGGTTCGAATGAAAACATATTGAAAATCAACTGAGAAAATTGACGATAA			900
Query 134	TCAAAATACTGACCTGCAAAGAAGCGCTGCATACGTCGATAAAAATGATTGTGGTAAGCAC			193
Sbjct 901	TCAAAATACTGACCTGCAAAGAAGCGCTGCATACGTCGATAAAAATGATTGTGGTAAGCAC			960
Query 194	TTGATGGGCAAGGCTTTAGATGCAGAAGAAAGATTACATGTTTGCTTTAAAATAATCACA			253
Sbjct 961	TTGATGGGCAAGGCTTTAGATGCAGAAGAAAGATTACATGTTTGCTTTAAAATAATCACA			1020
Query 254	AGCATGATGAGCGCAAAGCACTTTAAATGTGACTTGTTCCATTTTAGATATTTGTTAAG			313
Sbjct 1021	AGCATGATGAGCGCAAAGCACTTTAAATGTGACTTGTTCCATTTTAGAGATTTGTTAAG			1080
Query 314	ATAAGATATAACTCATTGAGATGTGTCATAGTATTCGTCGTTAGAAAACAATTATTATGA			373
Sbjct 1081	ATAAGATATAACTCATTGAGATGTGTCATAGTATTCGTCGTTAGAAAACAATTATTATGA			1140
Query 374	CATTATTTCAATGAGTTATCTATTTTTGTCGTGTACAGAGCTCTTTTTATTTTCTATTG			433
Sbjct 1141	CATTATTTCAATGAGTTATCTATTTTTGTCGTGTACAGAGCTCTTTTTATTTTCTATTG			1200
Query 434	ATCTGGTGTAAAATGAATAAATATTTACTTGCTATGTGGTTGCTTCTTTTTCTTT			493
Sbjct 1201	ATCTGGTGTAAAATGAATAAATATTTACTTGCTATGTGGTTGCTTCTTTTTCTTT			1260
Query 494	CTGGTTGTACGGTTCAGCATAATTTAATAAATGAAACCCCGAGTCAGATTGTTCAAGGAC			553
Sbjct 1261	CTGGTTGTACGGTTCAGCATAATTTAATAAATGAAACCCCGAGTCAGATTGTTCAAGGAC			1320

Query	554	ATAATCAGGTGATTCATCAATACTTTGATGaaaaaaaaCACCTCAGGTGTGCTGGTTATTC	613
Sbjct	1321	ATAATCAGGTGATTCATCAATACTTTGATGAAAAAAAAACACCTCAGGTGTGCTGGTTATTC	1380
Query	614	AAACAGATaaaaaaaaTTAATCTATATGGTAATGCTCTAAGCCGCGCAAATACAGAATATG	673
Sbjct	1381	AAACAGATAAAAAATTAATCTATATGGTAATGCTCTAAGCCGCGCAAATACAGAATATG	1440
Query	674	TGCCAGCCTCTACATTTAAAATGTTGAATGCCCTGATCGGATTGGAGAACCAGAAAACGG	733
Sbjct	1441	TGCCAGCCTCTACATTTAAAATGTTGAATGCCCTGATCGGATTGGAGAACCAGAAAACGG	1500
Query	734	ATATTAATGAAATATTTAAAATGGAAGGGCGAGAAAAGGTCATTTACCGCTTGGGAAAAAG	793
Sbjct	1501	ATATTAATGAAATATTTAAAATGGAAGGGCGAGAAAAGGTCATTTACCGCTTGGGAAAAAG	1560
Query	794	ACATGACACTAGGAGAAGCCATGAAGCTTTCTGCAGTCCCAGTCTATCAGGAACCTTGCGC	853
Sbjct	1561	ACATGACACTAGGAGAAGCCATGAAGCTTTCTGCAGTCCCAGTCTATCAGGAACCTTGCGC	1620
Query	854	GACGTATCGGTCTTGATCTCATGCAAAAAGAAGTAAAACGTATTTGGTTTCGGTAATGCT	913
Sbjct	1621	GACGTATCGGTCTTGATCTCATGCAAAAAGAAGTAAAACGTA-TTGGTTTCGGTAATGCT	1679
Query	914	GAAATTGGACAGGCA-GTTGATAATTTCTGGGTTGGTAGGACCATTAAAGGTTACGCCTA	972
Sbjct	1680	GAAATTGGACAG-CAGGTTGATAATTTCT-GGTTGGTAGGACCATTAAAGGTTACGCCTA	1737
Query	973	TTCAAGAGGTAGAGTTTGTTCCTCCCAATTAGCACATACACAGCTTTCATTTAGTGAAAA	1032
Sbjct	1738	TTCAAGAGGTAGAGTTTGTTCCTCCCAATTAGCACATACACAGC-TTCCATTTAGTGAAAA	1796
Query	1033	GTGCAGGCTAATGaaaaaaaaTTTGCTTCTTTTAGAAGAGAGTAATGGCTACAAAATTTT	1092
Sbjct	1797	GTGCAGGCTAATGTAAAAAATATGCTTCTTTTAGAAGAGAGTAATGGCTACAAAATTTT	1856
Query	1093	GGAAAAGCTGGTTGGG	1108
Sbjct	1857	GGAAAGACTGGTTGGG	1872

Hình 3.7. Kết quả đại diện so sánh giải trình tự sản phẩm PCR gen *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} với trình tự gen chuẩn

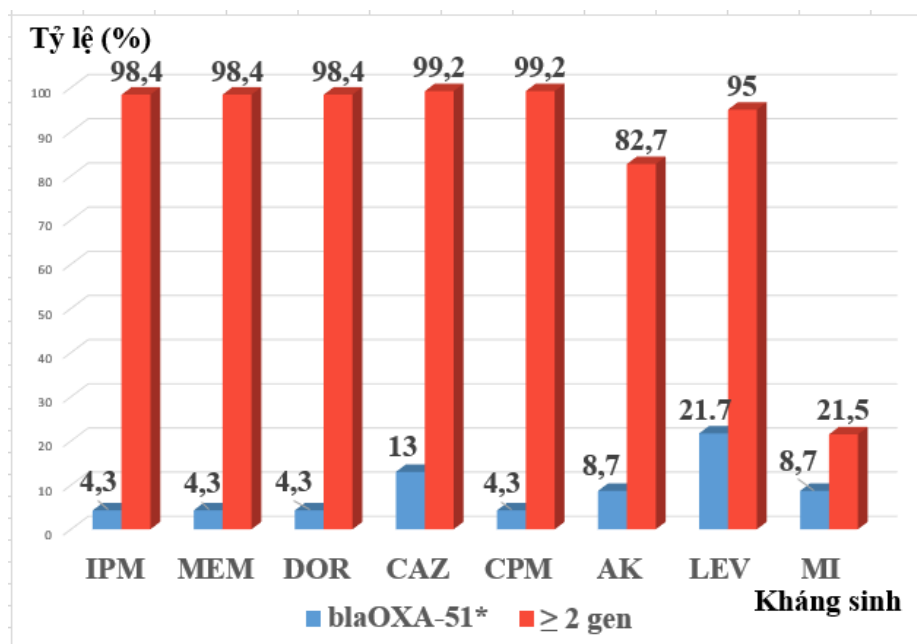
Kết quả PCR và giải trình tự sản phẩm PCR đoạn gen *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} của các chủng nghiên cứu như ở hình 3.6 và hình 3.8 (độ tương đồng 99% với trình tự gen *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} trên cơ sở dữ liệu của NCBI) đã khẳng định gen *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} phát hiện được trong nghiên cứu này là chính xác và đúng theo các tham chiếu quốc tế (kết quả giải trình tại phụ lục 7).

Tương tự, đối với các gen *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{NDM-1}, *ISAbal*, *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} kết quả giải trình tự sản phẩm PCR các gen tương ứng của các chủng nghiên cứu đã khẳng định các gen phát hiện được trong nghiên cứu này là chính xác và đúng theo các tham chiếu quốc tế (kết quả giải trình tự được trình bày tại phụ lục 3, 4, 5, 6, 7).



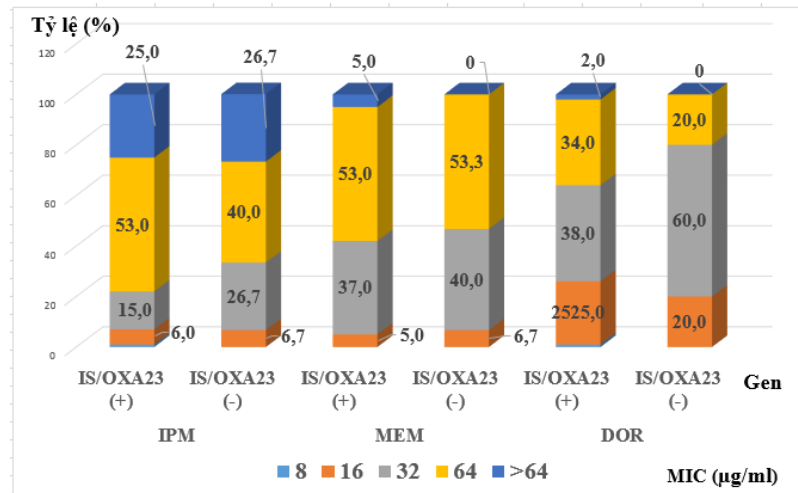
Biểu đồ 3.10. Tỷ lệ các gen mã hóa carbapenemase ở 2 nhóm CSAB VÀ CRAB

Đối với CSAB, ngoài *bla*_{OXA-51-like}, chỉ có 8,3% số chủng mang *bla*_{OXA-58-like} và 20,8% có *ISAbal*. Gen *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{NDM-1} *ISAbal/bla*_{OXA-51-like} chỉ có ở nhóm CRAB.



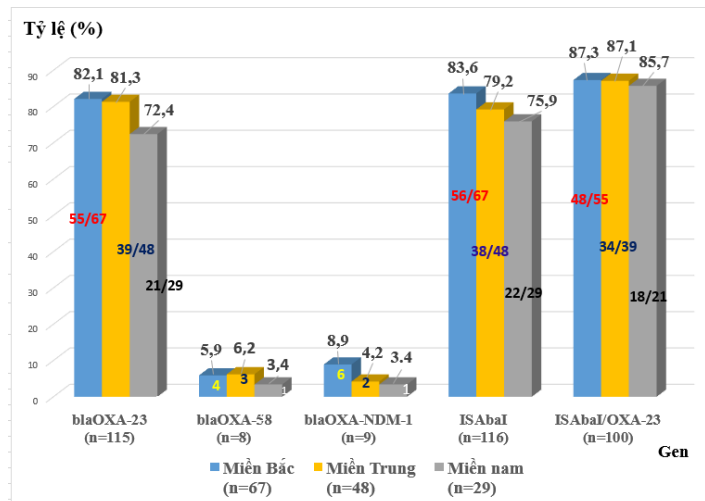
Biểu đồ 3.11. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của các chủng *A. baumannii* mang 1 và ≥ 2 gen mã hóa carbapenemase

Các chủng chỉ mang gen *bla*_{OXA-51-like} có tỷ lệ đề kháng với các KS thấp hơn nhiều so với các chủng có ≥ 2 gen mã hóa carbapenemase (với $p < 0,001$).



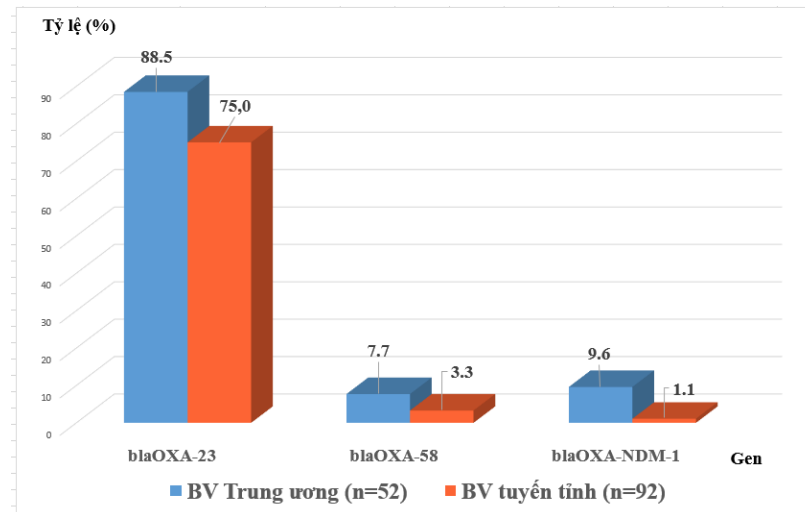
Biểu đồ 3.12. Tỷ lệ giá trị MIC của carbapenem giữa 2 nhóm mang *bla*_{OXA-23-like} có và không có *ISAbal/bla*_{OXA-23-like}

Tỷ lệ các giá trị MIC của 2 loại KS IPM và MEM gần tương tự nhau giữa các chủng mang *bla*_{OXA-23-like} có hoặc không có *ISAbal/bla*_{OXA-23-like}. Đối với DOR, nhóm chủng có *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} có tỷ lệ MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ cao hơn nhóm chủng không có *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} (sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$).



Biểu đồ 3.13. Tỷ lệ các gen mã hóa carbapenemase ở các chủng *A. baumannii* theo vùng miền

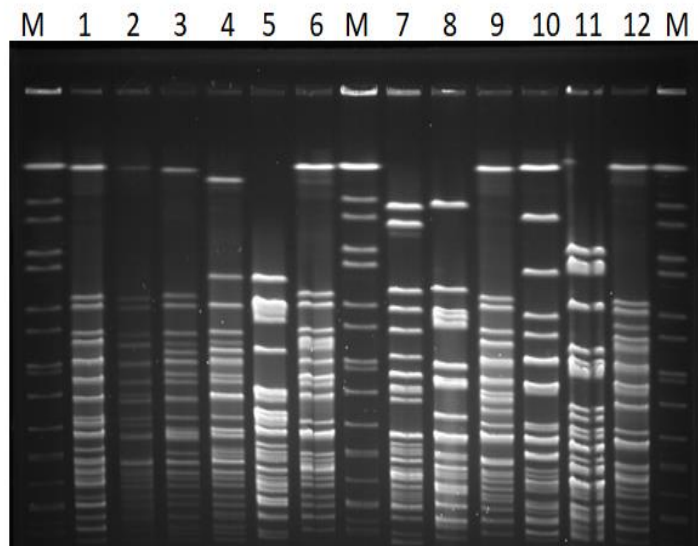
Các gen mã hóa carbapenemase đều có ở các chủng *A. baumannii* phân lập được tại các bệnh ở 3 miền với tỷ lệ gần tương tự nhau.



Biểu đồ 3.14. Tỷ lệ các gen mã hóa carbapenemase ở các chủng *A. baumannii* theo tuyến bệnh viện

Tỷ lệ các gen mã hóa carbapenemase ở các chủng *A. baumannii* phân lập được tại các bệnh viện tuyến trung ương cao hơn các bệnh viện tuyến tỉnh (tuy nhiên, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê chỉ đối với gen bla_{NDM-1} với $p < 0,05$).

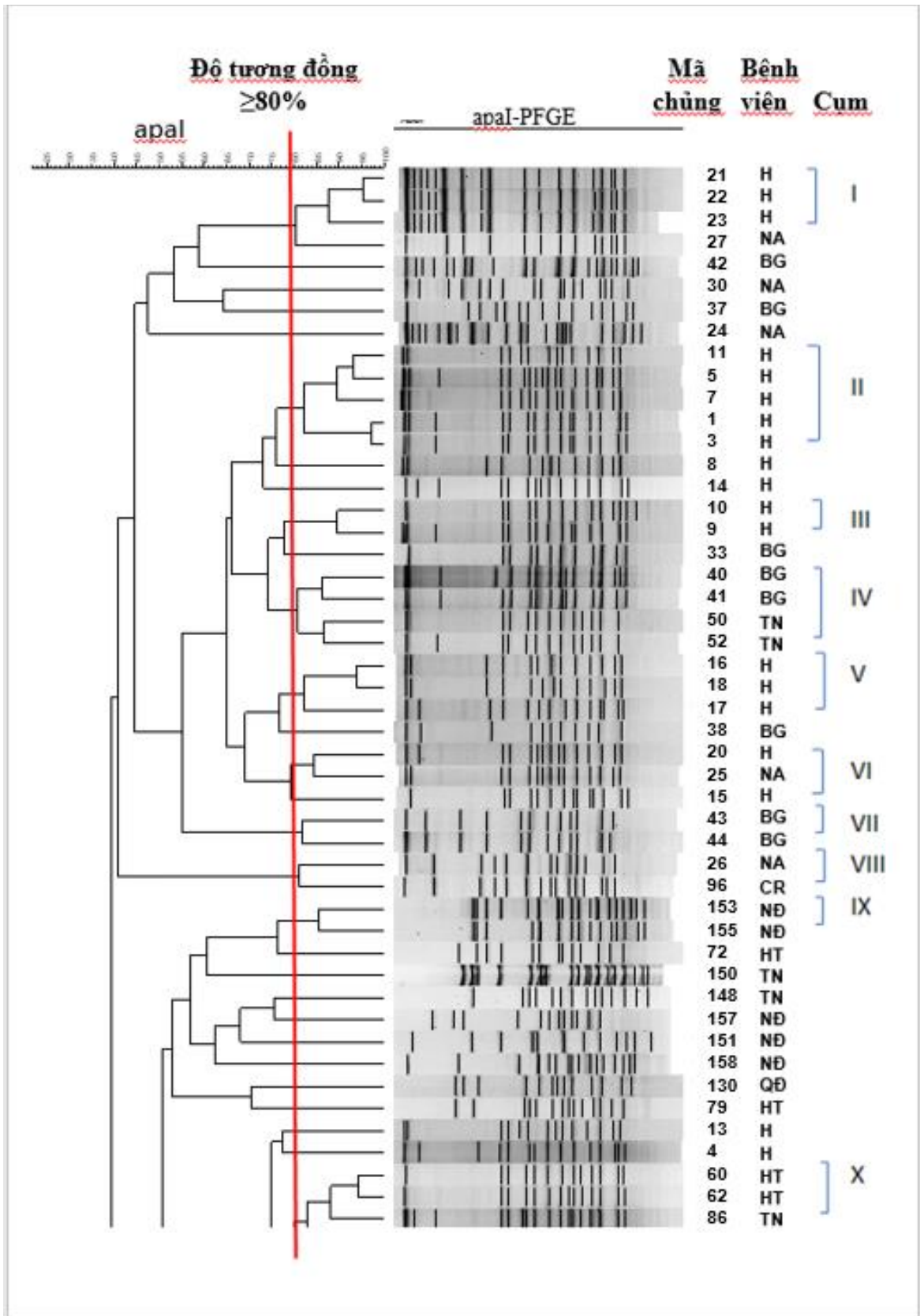
3.2.2. Xác định mối liên hệ kiểu gen PFGE và kiểu hình đề kháng kháng sinh của các chủng *A. baumannii*



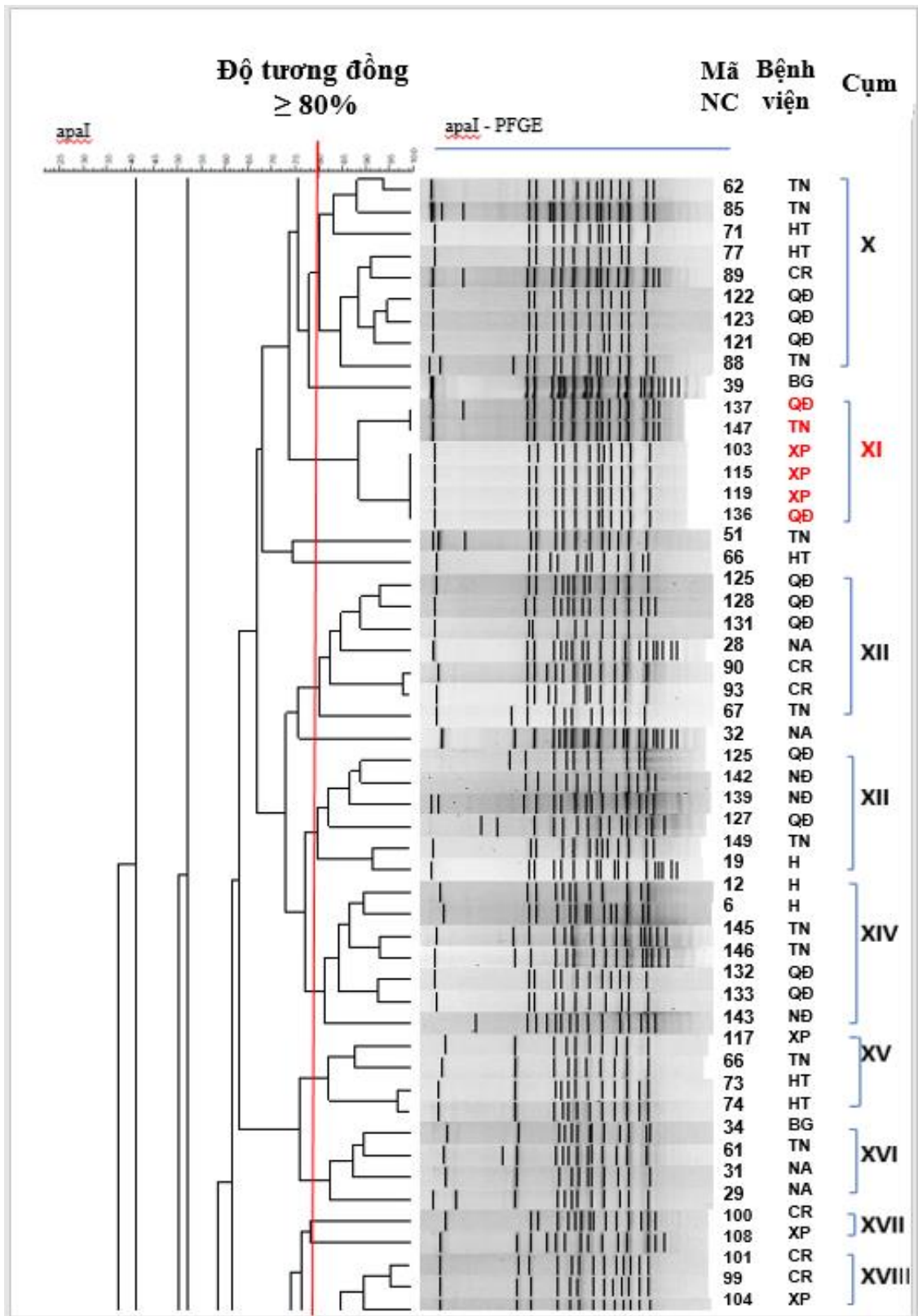
Hình 3.8. Hình ảnh đại diện cho kiểu gen PFGE của *A. baumannii*

Chú thích: M: Thang ADN chuẩn của *Salmonella braenderup* H9812

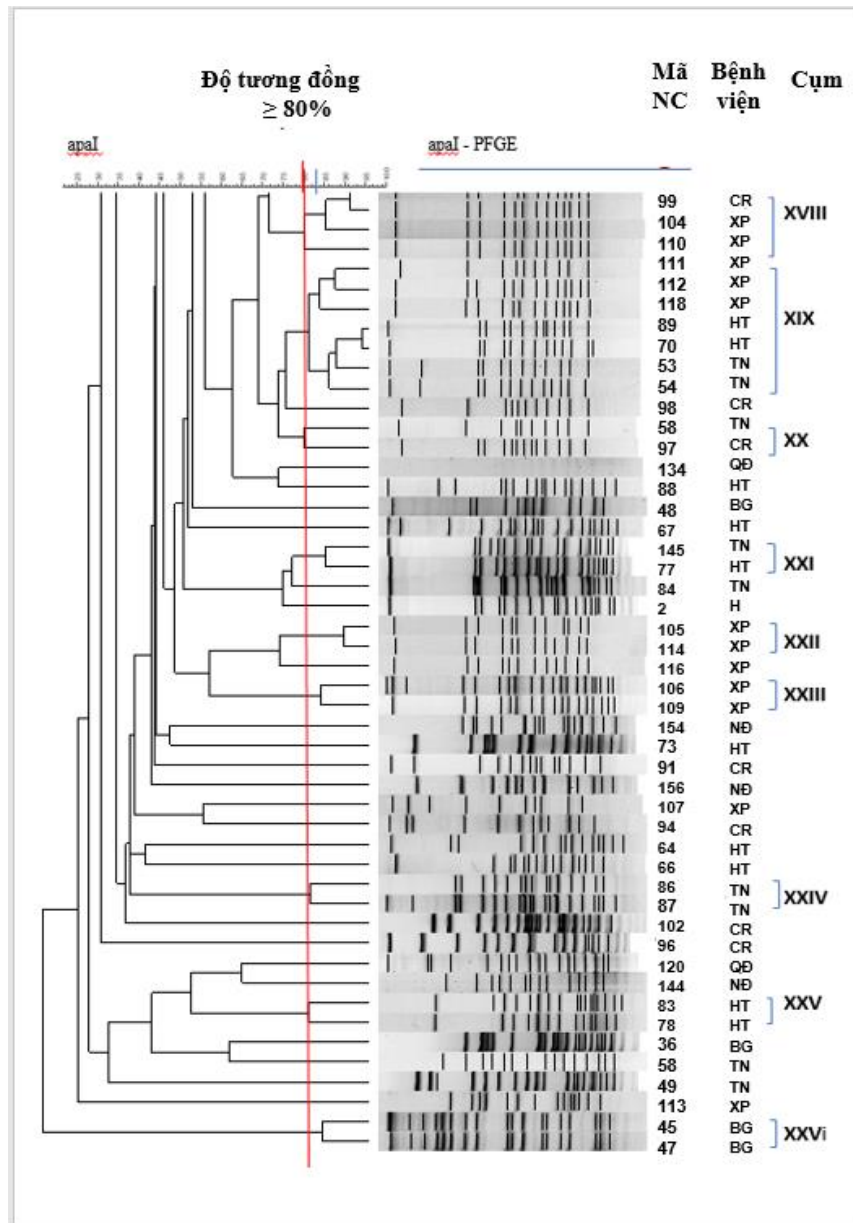
1-12: Là ADN của 12 chủng *A. baumannii* xác định kiểu gen PFGE



Hình 3.9A



Hình 3.9B

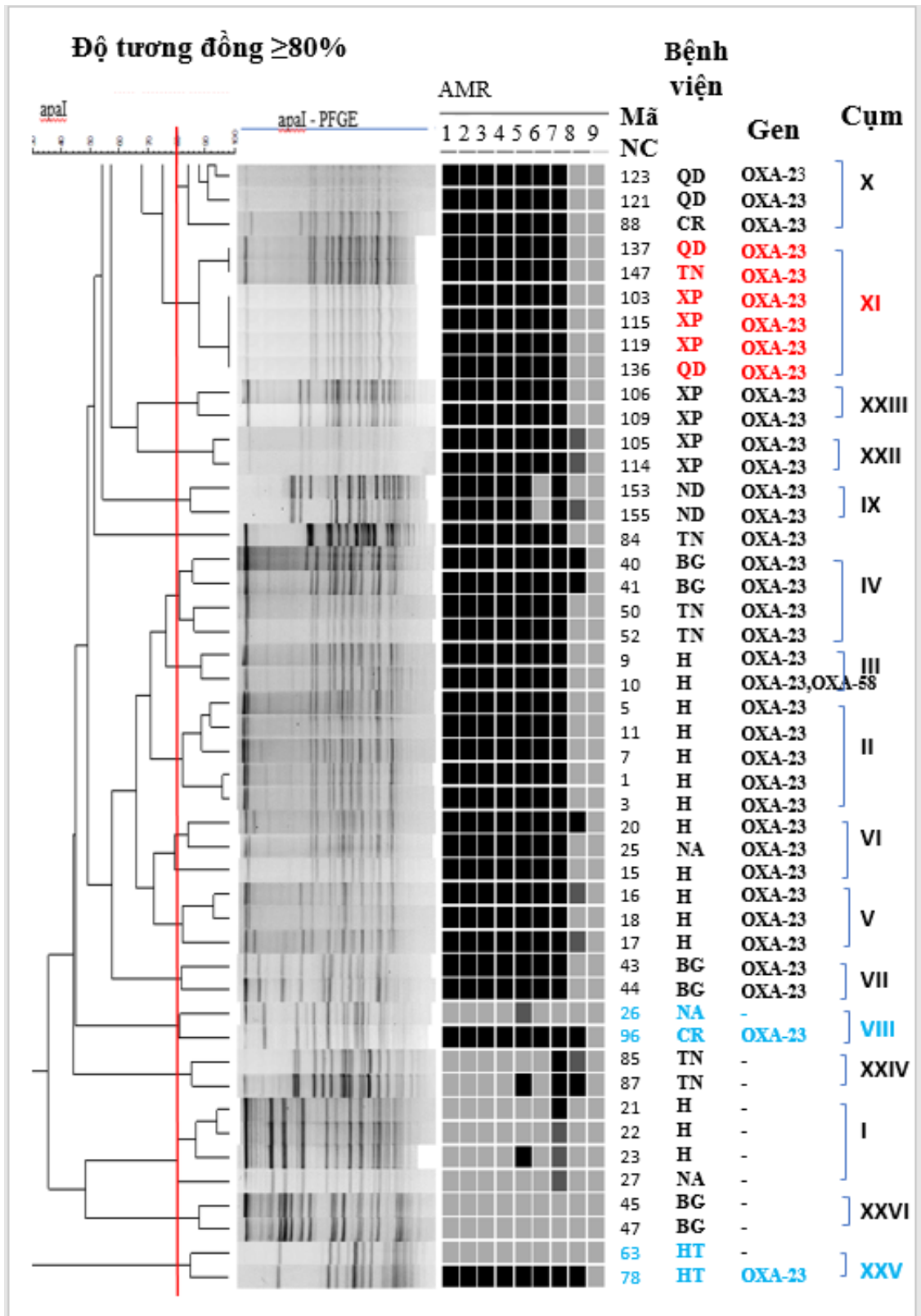


Hình 3.9C

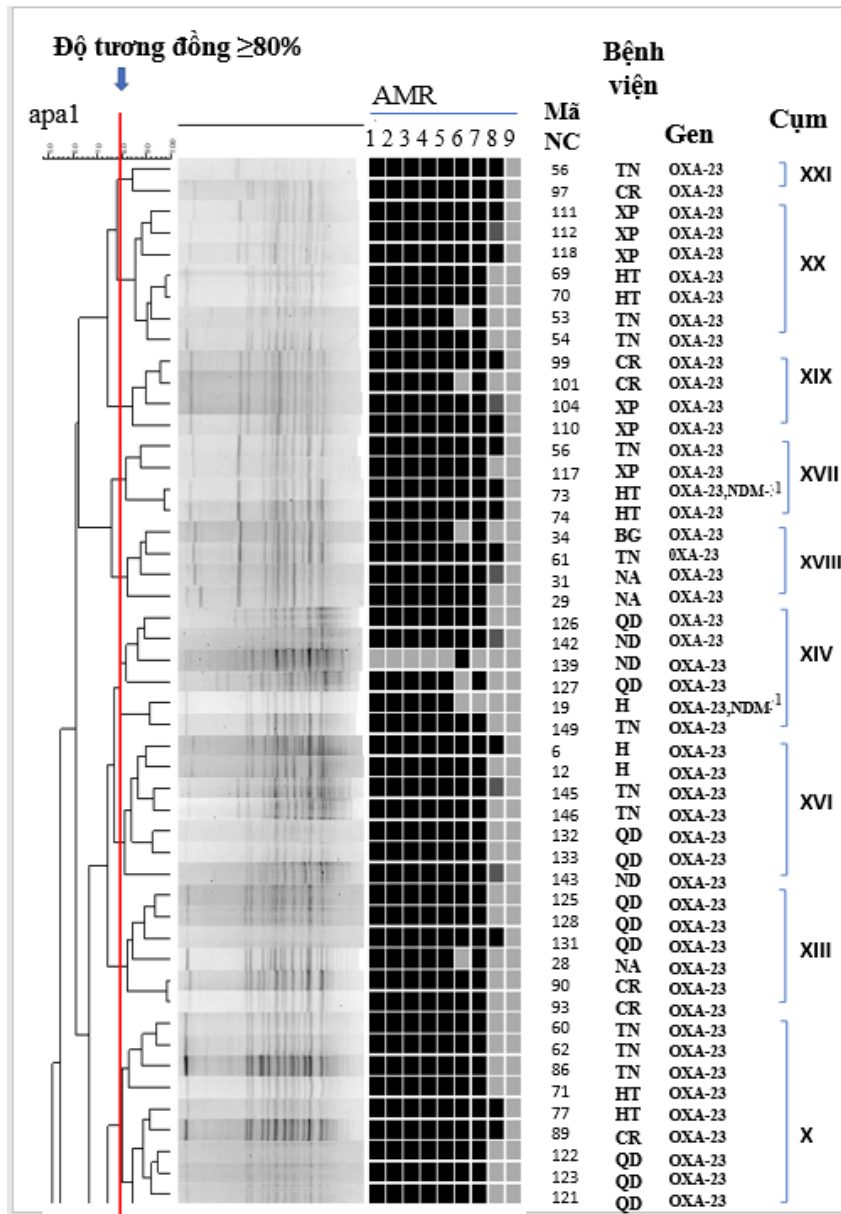
Hình 3.9 (hình 3.9A, 3.9B, 3.9C): Mối liên hệ kiểu gen của 144 chủng

***A. baumannii* phân lập tại 9 bệnh viện**

Kết quả PFGE tại hình 3.8 cho thấy, các chủng *A. baumannii* có kiểu gen đa dạng (với 26 cụm có độ tương đồng về kiểu gen $\geq 80\%$, trong đó có 2 cụm có độ tương đồng 100%). Các cụm tương đồng về kiểu gen gồm các chủng trong cùng 1 bệnh viện hoặc các bệnh viện và các vùng miền khác nhau.



Hình 3.10A



Hình 3.11B

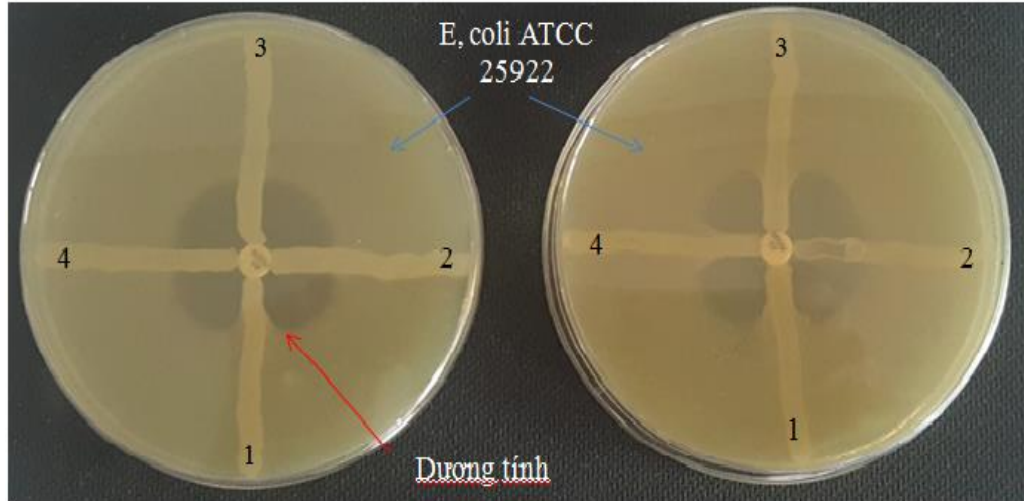
Hình 3.10 (hình 3.10A, 3.10B): Kiểu hình đề kháng ở các cụm có kiểu gen PFGE tương đồng

Ghi chú: AMR: Tính kháng kháng sinh (Nhạy cảm: □; Kháng/trung gian ■

1: IPM, 2: MEM, 3: DOR, 4: CPM, 5: CAZ, 6: AK, 7: LVX, 8: MI, 9: CO

Kiểu hình đề kháng kháng sinh của các chủng thuộc một cụm kiểu gen PFGE không hoàn toàn giống nhau. 15/26 cụm có sự khác biệt đối với kháng sinh minocycline, các kháng sinh khác ít có sự khác biệt hơn (3-5/26 cụm).

3.3. XÁC ĐỊNH MỐI LIÊN QUAN GIỮA MIC VỚI SỰ XUẤT HIỆN CARBAPENEMASE VÀ GEN MÃ HÓA CARBAPENEMASE

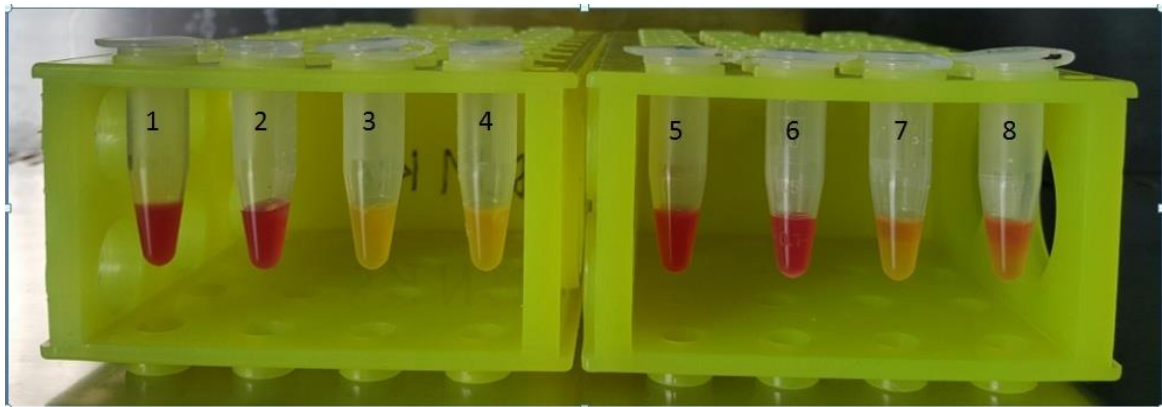


Hình 3.11. Ảnh kết quả đại diện thử nghiệm MHT (trái) và THT (phải)

Chú thích: 1: Chứng chứng dương; 2: Chứng chứng âm với carbapenemase.

3,4: Chủng A. baumannii kiểm tra sinh carbapenemase

Chủng 3,4: Âm tính với carbapenemase ở MHT nhưng dương tính ở THT



Hình 3.12: Ảnh kết quả đại diện cho kỹ thuật CarbAcineto NP

Ống 1: Chứng nội; ống 2: Chứng âm; ống 3: chứng dương; ống 4: Mẫu thử dương tính với carbapenemase có bla_{NDM-1} (Chuyển màu từ đỏ sang vàng hoàn toàn, trong vòng 20 phút); ống 7: Mẫu dương tính carbapenemase có bla_{OXA-23} (Từ đỏ sang vàng cam); ống 8: Mẫu có bla_{OXA-58} (Từ đỏ sang đỏ cam) (Đọc kết quả âm tính); Ống 5,6: Mẫu âm tính với Carbapenemase

Bảng 3.8. Tỷ lệ carbapenemase dương tính theo từng kỹ thuật

Kỹ thuật	MHT	THT	CarbAci NP	CarbAci NP cải tiến	CIM	Tính chung*
Số lượng	7/144 7 (Y)	117/144 5 (Y)	119/144 9 (N)	119/144 9 (N)	121/144	121/144
Tỷ lệ (%)	4,9	81,2	82,6	82,6	84,0	84,0

Chú thích: Tính chung: Tiêu chuẩn xác định 1 chủng sinh carbapenemase khi chủng đó cho kết quả “dương tính” với bất kỳ 1 trong 5 kỹ thuật.*

(Y): Dương tính yếu (Khó xác định dương tính/âm tính)

(N): Dương tính nhanh trong vòng 20 phút

Kỹ thuật CIM có tỷ lệ dương tính với carbapenemase cao nhất (84,0%). Tiếp đến là kỹ thuật CarbAcineto NP và CarbAcineto NP cải tiến (2 kỹ thuật này cho kết quả hoàn toàn tương đồng nhau) và cho kết quả dương tính nhanh (N) trong vòng 20 phút đối với chủng có *bla_{NDM-1}*. Kỹ thuật MTH cho tỷ lệ dương thấp nhất (trong đó, cả 7/7 cho kết quả dương tính yếu (Y)).

Bảng 3.9. Mối liên quan giữa MIC với carbapenemase dương tính theo từng kỹ thuật

Nhạy/kháng carbapenem	MIC (µg/ml)	Tỷ lệ carbapenemase dương tính						<i>p</i>	
		MHT	THT	CarbAcineto NP	CarbAcineto NP cải tiến	CIM	Tính chung*		Tổng
Nhạy cảm (n=24)	≤ 2 (n=24)	0	1 (Y)	1 (Y)	1 (Y)	2 (8,3)	2 (8,3)	2 (8,3)	<0,001
Đề kháng (n=120)	8 (n=2)	0	0	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	119/120	
	16 (n=6)	0	5 (83,3)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)		
	32 (n=20)	0	20 (100)	20 (100)	20 (100)	20 (100)	2 (100)	(99,2)	
	≥64 (n=92)	7 (Y) (7,6)	91 (98,9)	91 (98,1)	91 (98,1)	92 (100)	92 (100)		
TỔNG		7/144 (4,9)	117/144 (81,2)	119/144 (82,6)	119/144 (82,6)	121/144 (84,0)	121/144 (84,0)		

Có sự khác biệt về tỷ lệ dương tính với carbapenemase giữa 2 nhóm: CSAB với MIC ≤ 2 µg/ml và CRAB với MIC ≥ 8 µg/ml (8,3% so với 99,2%). Tuy nhiên, tỷ lệ dương tính với từng kỹ thuật khác nhau: CIM có tỷ lệ dương tính cao nhất, tiếp đến là CarbAcineto NP, CarbAcineto NP cải tiến. Đối với kỹ thuật THT và MHT, tỷ lệ dương tính cao hơn đối với các chủng có MIC cao. MHT chỉ dương tính yếu (Y) với chủng có MIC ≥ 64 µg/ml.

Bảng 3.10. Mối liên quan giữa gen mã hóa carbapenemase với carbapenemase dương tính theo từng kỹ thuật

Số lượng gen	Gen mã hóa carbapenemase	Dương tính với carbapenemase						Tổng	p
		MHT	THT	CarbAcineto NP	CarbAcineto NP cải tiến	CIM	Tính chung*		
1 gen (n=23)	<i>bla</i> _{OXA-51} *	0	0	0	0	0	0	0	
≥ 2 gen (n=121)	<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-58} (n=2)	0	1 (Y)	1 (Y)	1(Y)	2 (100)	2 (100)	121/121 (100)	-
	<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-23} (n=106)	4 (Y) (3,8)	103 (97,1)	105 (99,1)	105 (99,1)	106 (100)	106 (100)		
	<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{NDM-1} (n=2)	0	2 (Y) (100)	2 (N) (100)	2 (N) (100)	2 (100)	2 (100)		
	<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{OXA-58} (n=4)	1 (Y) (25,0)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)		
	<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{NDM-1} (n=5)	2 (Y) (100)	5 (100)	5 (N) (100)	5 (N) (100)	5 (100)	5 (100)		
	<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-58} + <i>bla</i> _{NDM-1} (n=2)	0	2 (Y) (100)	2 (N) (100)	2 (N) (100)	2 (100)	2 (100)		
Tổng		7/144	117/144	119/144	119/144	121/144	121/144		

Các chủng chỉ có *bla*_{OXA-51-like}, không có chủng nào dương tính (+) với carbapenemase. 100% chủng có ≥2 gen: dương tính với carbapenemase. Tuy nhiên, tỷ lệ (+) với carbapenemase là khác nhau giữa các kỹ thuật: CIM (+) 100% và là kỹ thuật duy nhất (+) với chủng mang *bla*_{OXA-51-like}+ *bla*_{OXA-58-like}; MHT có tỷ lệ (+) thấp nhất và chỉ cho kết quả (+) yếu (Y). CarbAcineto NP cho kết quả dương tính nhanh (N) đối với chủng có *bla*_{NDM-1} (khoảng 20 phút).

Bảng 3.11. Mối liên quan giữa MIC với sự xuất hiện carbapenemase và gen mã hóa carbapenemase ở *A. baumannii*

Gen carbapene- mase	MIC của IPM					Tỷ lệ carbapenemase dương tính						
	≤2	8	16	32	≥64	MHT	THT	Carb- Acineto NP	Carb- Acineto- NP cải tiến	CIM	Tính chung*	Tổng
<i>bla</i> _{OXA-51} * (n=23)	22 (83,3)					0	0	0	0	0	0	0
		1 (16,1)				0	0	0	0	0	0	
<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-58} (n=2)	2 (100)					0	1 (Y)	1 (Y)	1 (Y)	2	2	2/2 (100)
<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-23} (n=106)		1 (0,94)				0	0	1	1	1	1	106/106 (100)
			6 (5,7)			0	5	6	6	6	6	
				18 (16,9)		0	18	18	18	18	18	
					81 (76,4)	4	80	80	80	81	81	

<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-58} + <i>bla</i> _{OXA-23} (n=4)					4 (100)	1 (Y)	4	4	4	4	4	4/4 (100)
<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{NDM-1} (n=2)				1 (50,0)		0	1 (Y)	1 (N)	1 (N)	1	1	2/2 (100)
					1 (50,0)	0	1 (Y)	1 (N)	1 (N)	1	1	
<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-23} + <i>bla</i> _{NDM-1} (n=5)					5 (100)	2 (Y)	5	5 (N)	5 (N)	5	5	5/5 (100)
<i>bla</i> _{OXA-51} + <i>bla</i> _{OXA-58} + <i>bla</i> _{NDM-1} (n=2)				1 (50,0)		0	1 (Y)	1 (N)	1 (N)	1	1	2/2 (100)
					1 (50,0)	0	1 (Y)	1 (N)	1 (N)	1	1	
Tổng	24/144	2/144	6/144	20/144	92/144	7/144	117/144	119/144	119/144	121/144	121/188	121/144

Trong 23 chủng dương tính duy nhất với *bla*_{OXA-51-like}, 22/23 chủng có MIC của IPM ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$, 01/23 chủng có MIC = 8 $\mu\text{g/ml}$ và tất cả đều âm tính với carbapenemase. 100% chủng mang gen *bla*_{OXA-23-like} và hoặc *bla*_{NDM-1} có MIC của IPM từ 8 - ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ và dương tính với carbapenemase. Tỷ lệ dương tính với carbapenemase ở chủng có MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ thấp hơn nhiều so với chủng có MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ (8,3% so với 99,2%) (với $p < 0,001$).

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. XÁC ĐỊNH NỒNG ĐỘ ỨC CHẾ TỐI THIỂU (MIC) CỦA CARBAPENEM VỚI CÁC CHỦNG *A. BAUMANNII*

4.1.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện chọn có chủ đích tại 9 bệnh viện ở 3 miền của Việt Nam. Trong đó, có 4 bệnh viện ở miền Bắc, 3 bệnh viện ở miền Trung và 2 bệnh viện ở miền Nam. Mỗi miền có 1 bệnh viện tuyến trung ương và các bệnh viện tuyến tỉnh. Do việc thu thập mẫu khó khăn nên số lượng mẫu thu thập ở các bệnh viện chưa được cân đối, đặc biệt ở miền Nam chỉ thu thập được mẫu từ 2 bệnh viện (ít hơn so với miền Bắc và miền Trung).

Việc xác định chính xác về mức độ loài của *Acinetobacter* là rất cần thiết vì các loài *Acinetobacter* khác nhau có sự khác nhau về đặc điểm sinh học, khả năng gây bệnh, tính nhạy cảm và cơ chế đề kháng kháng sinh. *A. baumannii* thường gây bệnh với mức độ nặng hơn, khả năng đề kháng kháng sinh và tỷ lệ tử vong cao hơn các loài *Acinetobacter* khác [46],[50],[152]. Tuy nhiên, rất khó để phân biệt chính xác các loài trong phức hợp *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* complex (ABC complex), gồm: *A. baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter seifertii*, *Acinetobacter dijkschoorniae* và *Acinetobacter calcoaceticus* do chúng có liên quan rất chặt chẽ với nhau, biểu hiện về kiểu hình và các tính chất sinh hóa gần tương tự nhau [153].

Với các phương pháp xác định kiểu hình hiện có, như: bộ định danh API 20NE (BioMerieux, Pháp), hệ thống định danh tự động thương mại (VITEK 2, Phoenix, Biolog, MicroScan WalkAway) không đủ chính xác để xác định và phân biệt các loài trong phức hợp ABC complex [78],[79]. Một nghiên cứu trên 130 chủng *Acinetobacter spp.* được xác định bằng phương

pháp lai ADN với 18 loài gen khác nhau đã được sử dụng để đánh giá khả năng xác định loài của *Acinetobacter* bằng bộ định danh API 20NE (với phiên bản 5.1) cho thấy API 20NE có độ chính xác là 87% [79].

Gen *bla*_{OXA-51-like} được xác định là gen nội tại tự nhiên nằm trên nhiễm sắc thể của *A. baumannii*. Kết quả của một số nghiên cứu cho thấy việc phát hiện gen *bla*_{OXA-51-like} có thể được sử dụng như một cách khá đơn giản và đáng tin cậy để xác định *A. baumannii* [77],[78]. Theo kết quả nghiên cứu của Turton và CS trên các chủng *Acinetobacter* nhận được từ các phòng thí nghiệm tham chiếu của Anh (năm 2005 - 2006), gen *bla*_{OXA-51-like} nằm trên nhiễm sắc thể của 141 chủng *A. baumannii* (Được xác định bằng giải trình tự 16sRNA) đại diện cho 23 kiểu gen, nhưng không được xác định ở 22 loài *Acinetobacter* khác [77]. Tương tự, một nghiên cứu khác, với 2582 chủng *Acinetobacter spp.* được phân lập trên lâm sàng từ 27 tỉnh ở Trung Quốc (2009-2010). Đã xác định gen *bla*_{OXA-51-like} có mặt ở 2196/2197 chủng *A. baumannii* (ngoại trừ 01 chủng *A. baumannii* duy nhất có IS*Aba19* chèn vào gen *bla*_{OXA-51-like} làm thay đổi cấu trúc của gen này dẫn đến kết quả âm tính giả) và không có chủng nào trong 385 chủng thuộc nhóm không phải là *A. baumannii* có gen *bla*_{OXA-51-like} [78]. IS*Aba15* và IS*Aba19* chèn vào cấu trúc của gen *bla*_{OXA-51-like} cũng được xác định ở *A. baumannii* (được phân lập từ nhiều nơi trên thế giới) với tỷ lệ thấp (chỉ là 3/672, 0,5%) [154].

Tuy nhiên, cũng có những nghiên cứu cho thấy có kết quả dương tính giả trong việc sử dụng gen *bla*_{OXA-51-like} để xác định *A. baumannii*. Nhưng tỷ lệ này ở các nghiên cứu khá khác nhau (dao động từ 0,9 - 5,5%). Theo kết quả của một nghiên cứu tại một bệnh viện ở Đài Bắc (Trung Quốc), chỉ có 6/679 (0,9%) số chủng không phải là *A. baumannii* có plasmid mang gen *bla*_{OXA-51-like} và có IS*Aba1* ở vùng trước của gen này [155]. Trong khi đó, tỷ lệ này là 5,5% trong số 74 chủng không phải *A. baumannii* được phân lập tại 10 trung

tâm y tế ở Đài Loan (năm 2007) [156]. Tuy nhiên, các chủng *Acinetobacter spp.* mang plasmid chứa IS*Aba1*/*bla*_{OXA-51-like} ở nghiên cứu này chủ yếu là do sự truyền plasmid giữa các dòng vô tính [157]. Điều này có thể giải thích cho tỷ lệ khá cao các chủng mang plasmid chứa IS*Aba1*/*bla*_{OXA-51-like} ở nghiên cứu này (5,5%) so với các nghiên cứu khác (0,9%).

Từ những kết quả trên cho thấy, việc định danh các chủng vi khuẩn nói chung và *A. baumannii* nói riêng đều khó đạt được độ chính xác 100% kể cả đối với các kỹ thuật sinh học phân tử. Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu sử dụng kỹ thuật nuôi cấy phân lập dựa vào một số tính chất kiểu hình kết hợp với phát hiện gen *bla*_{OXA-51-like} và định danh bằng công nghệ khối phổ MALDI TOF để xác định *A. baumannii*.

Trong số 144 chủng *A. baumannii*, 78,5% số chủng phân lập được từ mẫu bệnh phẩm là dịch tiết đường hô hấp (đờm, dịch hút khí phế quản), tiếp đến là bệnh phẩm ngoài da, mô mềm (13,2%), bệnh phẩm máu và nước tiểu chiếm tỷ lệ thấp (5,6% và 2,8%). Mặc dù, phương pháp chọn mẫu nghiên cứu là ngẫu nhiên, không phải là mẫu toàn bộ, nhưng tỷ lệ chủng nghiên cứu được phân lập từ mẫu bệnh phẩm đường hô hấp là cao nhất, điều này phù hợp với thực tế nhiễm khuẩn đường hô hấp là bệnh lý nhiễm khuẩn thường gặp nhất (Khoảng 80% các trường hợp NKBV) [16].

4.1.2. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của carbapenem với các chủng *A. baumannii*

Trong 144 chủng *A. baumannii* được thử nghiệm xác định mức độ nhạy cảm với 09 loại kháng sinh, kết quả là 7/9 kháng sinh đã bị kháng trên 70,8% (trong đó 6/9 kháng sinh bị kháng $\geq 83,3\%$) (bảng 3.4).

24 chủng (16,7%) nhạy cảm với carbapenem và 120 chủng (83,3%) đề kháng với carbapenem. Giá trị MIC₅₀ và MIC₉₀ của các kháng sinh carbapenem lần lượt là 32 - 64 $\mu\text{g/ml}$ và $\geq 64 \mu\text{g/ml}$; ceftazidime và cefepime

là 128 µg/ml và >128 µg/ml; levofloxacin là 64 µg/ml và > 64 µg/ml; amikacin đều >256 µg/. Tỷ lệ chủng *A. baumannii* còn nhạy cảm với minocyclin là cao nhất (65,3%) trong các KS thử nghiệm (trừ KS colistin). Colistin là kháng sinh duy nhất chưa phát hiện chủng đề kháng. Dải giá trị MIC của colistin từ < 0,25 – 1 µg/ml, MIC₅₀ = 0,25 µg/ml, MIC₉₀ = 0,5 µg/ml (bảng 3.4).

Tỷ lệ đề kháng với các kháng sinh của các chủng *A. baumannii* phân lập được từ các bệnh viện theo vùng miền không hoàn toàn như nhau, nhưng không có sự khác biệt về dải giá trị MIC, MIC₅₀, MIC₉₀ của các kháng sinh (bảng 3.5).

Mặc dù, việc lựa chọn mẫu trong nghiên cứu này là ngẫu nhiên (không phải là mẫu toàn bộ) nên tỷ lệ đề kháng với kháng sinh của các chủng *A. baumannii* trong nghiên cứu có thể chưa hoàn toàn chính xác nhưng cũng phần nào phản ánh được mức độ đề kháng trên thực tế. Kết quả của nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như của nhiều nghiên cứu khác trong và ngoài nước [16],[17],[158]. Theo kết quả nghiên cứu trên 253 chủng *A. baumannii* phân lập từ các nước ở Châu Á, 82,5% đề kháng với carbapenem, tỷ lệ đề kháng với các kháng sinh khác (ngoại trừ polymyxin) cũng rất cao: 86,5% (ceftazidime), 76,2% (gentamicin), 89,7% (ciprofloxacin), 86,1% (piperacillin -tazobactam) [158].

Kết quả nghiên cứu tại 15 ICU ở Việt Nam (năm 2012-2013), trong số 726 vi khuẩn phân lập được nuôi cấy từ các bệnh nhân bị nhiễm khuẩn bệnh viện, thường gặp nhất là *A. baumannii* (24,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (13,8%) và *Klebsiella pneumoniae* (11,6%) với tỷ lệ đề kháng carbapenem của *A. baumannii* là 89,2% cao hơn nhiều so với *P. aeruginosa* (55,7%) và *K. pneummoniae* (14,9%) [16]. Hơn nữa, *A. baumannii* cũng là căn nguyên đứng đầu (chiếm 51,7%) ở bệnh nhi viêm phổi thở máy, trong khi *P. aeruginosa* và

Klebsiella pneumoniae chiếm tỷ lệ thấp hơn hẳn (16,8% và 12,1%) và với tỷ lệ đề kháng của *A. baumannii* cũng rất cao, gần 90% đối với carbapenem [115].

Mức độ đề kháng carbapenem ở nghiên cứu của chúng tôi đã cao hơn so với nghiên cứu trên các chủng *A. baumannii* gây nhiễm khuẩn huyết ở một số bệnh viện thuộc 3 miền của Việt Nam (năm 2011-2012) [121], tỷ lệ kháng carbapenem là 83,3% so với 57,2% (đối với meropenem); MIC₅₀ và MIC₉₀ của carbapenem tương ứng là 32 – 64 µg/ml và 64 -> 64 µg/ml so với 8 µg/ml và 16 µg/ml. Như vậy, đã có sự phát triển mức độ đề kháng với carbapenem nhanh theo thời gian ở các chủng *A. baumannii* gây bệnh ở Việt Nam.

Năm 1985, imipenem được đưa vào sử dụng trên lâm sàng để điều trị nhiễm trùng do vi khuẩn MDR. Nhưng sự đề kháng với kháng sinh này đã được báo cáo trong cùng năm đó từ một chủng *A. baumannii* kháng imipenem phân lập được trên một bệnh nhân ở Scotland năm 1985 [159]. Sau 10 năm, với các chủng *Acinetobacter spp.* được thu thập từ 1994 - 1995 trên bệnh nhân ở ICU của 5 nước thuộc châu Âu cho thấy, đã có sự giảm tính nhạy cảm với imipenem: 88% ở Bỉ, 91% ở Pháp, 84% ở Tây Ban Nha và 81% ở Thụy Điển [56]. Theo kết quả phân tích về mức độ đề kháng sinh của *A. baumannii* toàn cầu, chỉ mất 11 năm (từ năm 2006 - 2016) để tỷ lệ đề kháng của *A. baumannii* đối với imipenem tăng từ 23,8% lên 73,9% ở các nước thuộc OECD (Organization for Economic Co-operation and Development - Tổ chức hợp tác và phát triển kinh tế). Sự gia tăng tỷ lệ kháng kháng sinh ở các nước OECD còn nhanh hơn so với các nước không thuộc OECD trong 11 năm qua. Hiện nay, tỷ lệ kháng imipenem gần tương tự nhau (73,9% và 77,8%) và cả hai khối đều phải đối mặt với mức độ nghiêm trọng của tình trạng đề kháng kháng sinh (tuy nhiên, tỷ lệ đề kháng có sự khác biệt giữa các nước trong cùng một khối) [57].

144 chủng *A. baumannii* trong nghiên cứu này, 24 chủng (16,7%) nhạy cảm với kháng sinh carbapenem (IPM, MEM và DOR). Đối với các chủng *A. baumannii* nhạy cảm với carbapenem, MIC $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ là chủ yếu (biểu đồ 3.1). Như vậy, đối với các chủng nhạy cảm với carbapenem thì các kháng sinh này còn rất hiệu quả trong điều trị nhiễm khuẩn do *A. baumannii*. Hơn nữa, đối với nhóm các chủng nhạy cảm với carbapenem, tỷ lệ chủng nhạy cảm với các kháng sinh cũng khác còn khá cao, 70,9%, 83,3%, 83,3% và 58,3% số chủng còn nhạy cảm với CAZ, CPM, AK và LEV (biểu đồ 3.2, 3.3, 3.4, 3.5)

Ngược lại, 120 chủng (83,3%) kháng với cả 3 loại kháng sinh carbapenem. DOR là kháng sinh nhóm carbapenem được đưa vào sử dụng trên lâm sàng sau cùng (năm 2007) sau 22 năm so với IPM (năm 1985) và MEM (năm 1996). Theo những nghiên cứu ban đầu, DOR là carbapenem có các đặc tính tốt nhất do được kết hợp hoạt động đặc biệt của imipenem chống lại cầu khuẩn Gram dương và hoạt động của meropenem đối với vi khuẩn Gram âm. Mặc dù vậy, trong nghiên cứu của tôi, DOR cũng đã bị kháng tương tự như đối với IPM và MEM. Tuy nhiên, giá trị MIC của DOR thấp hơn so với của IPM và MEM, tỷ lệ DOR có MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ là 29,2% so với 64,5% và 47,9% của IPM và MEM (biểu đồ 3.1). Điều này có thể được lý giải do DOR ít bị thủy phân hơn bởi một số loại beta-lactamase lớp A, C, D so với IPM và MEM [160]. Tỷ lệ MIC = 8 $\mu\text{g/ml}$ rất thấp (0,7% đối với cả 3 loại carbapenem), trong khi MIC ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ chiếm $\geq 64,5\%$. Như vậy, không có khả năng tăng liều đối với các kháng sinh carbapenem để điều trị nhiễm khuẩn do các chủng *A. baumannii* có kết quả thử nghiệm đã kháng carbapenem. Đồng thời, các chủng đề kháng carbapenem cũng đề kháng rất cao với các kháng sinh khác, như CAZ (99,2%), CPM (97,5%) và với 97,5% và 86,7% số chủng có MIC ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$; 85,0% số chủng đề kháng với AK và 80,0% số chủng có MIC ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$. Tương tự, 95,0 % số chủng đề kháng với LEV và MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ là 67,5%.

Theo kết quả bảng 3.6, giá trị MIC₅₀, MIC₉₀ và tỷ lệ đề kháng với một số kháng sinh (ngoại trừ colistin và minocyclin) ở nhóm chủng nhạy cảm với carbapenem thấp hơn hẳn so với nhóm đề kháng với carbapenem (sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$). Như vậy, có mối liên quan giữa nhạy/kháng carbapenem với nhạy/kháng với một số kháng sinh khác như CPM, CAZ, AK, LEV. Riêng đối với kháng sinh MI, ở cả 2 nhóm nhạy cảm và kháng với carbapenem, tỷ lệ chủng còn nhạy cảm với MI còn khá cao (87,5% và 62,5%) (sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$).

Kết quả nghiên cứu của tôi cũng tương đồng với nhiều nghiên cứu khác. Mặc dù theo các định nghĩa về MDR và XDR đối với vi khuẩn không nhất thiết yêu cầu kháng với carbapenem [161], nhưng các chủng *A. baumannii* kháng carbapenem có xu hướng XDR, có khả năng kháng tất cả các loại kháng sinh khác, ngoại trừ polymyxin, tigecycline và đôi khi là aminoglycoside [162].

Nghiên cứu của tôi không thực hiện đối với tất cả các kháng sinh được khuyến cáo thử nghiệm cho *A. baumannii* nên không kết luận được tỷ lệ vi khuẩn MDR, XDR và PDR [161]. Nhưng, có ít nhất 83,3% số chủng là MDR, trong đó 99,2% số chủng kháng carbapenem là MDR và tỷ lệ này chỉ là 4,2% trong số chủng nhạy cảm với carbapenem. Tương tự kết quả nghiên cứu của Nguyễn Tuấn Anh và CS, khi nghiên cứu trên 160 chủng *A. baumannii* phân lập trên bệnh nhân từ 3 bệnh viện ở miền Nam năm 2012-2014, 74% số chủng là MDR và XDR, 98,3% đề kháng imipenem trong số các chủng *A. baumannii* XDR [20].

MDR là kiểu đề kháng rất thường gặp ở *A. baumannii* [57],[23]. Tỷ lệ MDR ở *A. baumannii* thuộc các nước OECD dao động từ 27,3 - 86,5% và ở các nước không thuộc OECD là 69,9 - 90,8% [57]. MDR ở *A. baumannii* cao hơn nhiều so với *P. aeruginosa* (82% so với 42,8%) [163]. Điều này có thể

được lý giải bởi các yếu tố quyết định đề kháng kháng sinh ở *A. baumannii* thường được kết hợp trong các yếu tố di truyền di động, như IS, transposon, gen cassette, integron và cụm gen kháng [6]. Integron là cơ chế di truyền cho phép vi khuẩn thích nghi, phát triển và đặc biệt là khả năng đề kháng kháng sinh thông qua việc thu nhận, lưu giữ và biểu hiện của các gen mới qua các băng gen (gen cassette) và mảng băng gen (gen cassette array). Integron có liên quan đáng kể với khả năng đề kháng với một số kháng sinh nhất định, bao gồm beta-lactam, aminoglycosides, quinolones. Nhiều nghiên cứu cho thấy integron có vai trò quan trọng trong phát triển tính MDR ở *A. baumannii* [11],[68]. Theo kết quả của một nghiên cứu ở Trung Quốc, 98,2% số chủng *A. baumannii* mang integron là đa kháng kháng sinh và tỷ lệ này chỉ là 12,0% đối với các chủng không có integron [68]. Các integron mang gen đề kháng kháng sinh đã phát sinh trong quá trình tiến hóa, dưới áp lực chọn lọc do việc sử dụng kháng sinh của con người. Hiện nay, nhiều nhóm integron mang gen đề kháng kháng sinh được tìm thấy trong các vi khuẩn gây bệnh được xác định là do sự tiến hóa gần đây [67].

A. baumannii nhanh chóng tích lũy các yếu tố quyết định đề kháng với các nhóm kháng sinh. Hiện nay, chúng đã kháng được với tất cả các loại KS hiện có sử dụng trên lâm sàng kể cả colistin - là phương thức cuối cùng để điều trị *A. baumannii* đa kháng [60],[61],[62].

Trong nghiên cứu của tôi, chưa phát hiện *A. baumannii* kháng colistin và phân bố dải giá trị MIC của colistin từ $< 0,25 - 1 \mu\text{g/ml}$; $\text{MIC}_{50} = 0,25 \mu\text{g/ml}$, $\text{MIC}_{90} = 0,5 \mu\text{g/ml}$. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu trên các chủng *A. baumannii* phân lập tại Khoa Điều trị tích cực Bệnh viện Bạch Mai (2011-2015), MIC_{90} colistin từ $0,19 - 0,5 \mu\text{g/ml}$, thấp hơn so với *P. aeruginosa* ($1 - 2 \mu\text{g/ml}$) (được xác định bằng phương pháp E-test) [17]. Theo kết quả của một nghiên cứu trên 160 chủng *A.*

baumannii phân lập tại Bệnh viện Đa khoa Thống Nhất Đồng Nai (năm 2017-2018), 100% nhạy cảm với colistin và MIC₉₀ = 1 µg/ml [23].

Kết quả nghiên cứu về tính nhạy cảm của *A. baumannii* đối với colistin ở Việt Nam khá khác nhau. Nhiều nghiên cứu cho thấy, *A. baumannii* còn nhạy cảm 100% với colistin [17],[19],[22],[23],[115],[164]. Tuy nhiên, đã có những nghiên cứu báo cáo về đề kháng colistin ở *A. baumannii* tại một số bệnh viện của Việt Nam [20],[116]. Theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Tuấn Anh và CS, khi nghiên cứu 160 chủng *A. baumannii* phân lập tại 3 bệnh viện ở miền Nam (năm 2012-2014) cho thấy, tỷ lệ đề kháng colistin ở 1 bệnh viện rất cao (12/38, 31,6%) và 1 bệnh viện khác có tỷ lệ đề kháng colistin thấp hơn (1/78, 1,3%) (được thực hiện bằng kỹ thuật khoanh giấy kháng sinh khuếch tán trong thạch) [20]. Một nghiên cứu khác trên các chủng vi khuẩn phân lập tại một số bệnh viện Thành phố Hồ Chí Minh (2010 - 2014) phát hiện được 18 chủng vi khuẩn (trong đó có 7 chủng *A. baumannii*) kháng colistin, 56% số chủng có MIC \geq 32 µg/ml [116].

Hiện nay ở Việt Nam, các nghiên cứu đánh giá về mức độ nhạy cảm của vi khuẩn với colistin sử dụng các phương pháp khác nhau, như hệ thống định danh và xác định MIC tự động (Phoenix 100 - hãng Becton Dickinson, Hoa Kỳ; VITEK2 - hãng BioMerieux, Pháp) [19],[115], phương pháp pha loãng kháng sinh trong thạch [22] và phương pháp kháng sinh khuếch tán trong thạch [20], phương pháp E-test [17],[23].

Theo một số nghiên cứu cho thấy, kết quả của một số phương pháp xác định MIC của colistin không đồng nhất, có thể cho kết quả đề kháng giả hoặc nhạy cảm giả [117],[118]. Do colistin có kích thước phân tử lớn nên khả năng khuếch tán kém trong môi trường thạch, do đó với phương pháp kháng sinh pha loãng trong thạch hoặc khoanh giấy khuếch tán có độ chính xác không

cao. Theo nghiên cứu hồi cứu trên 202 chủng CRAB xác định MIC của colistin bằng 4 phương pháp khác nhau cho thấy, phương pháp kháng sinh pha loãng trong thạch có tỷ lệ đề kháng giả là 9,4% [118].

Tuy nhiên, với phương pháp vi pha loãng trong môi trường lỏng cũng có thể cho kết quả sai nếu thực hiện trên các đĩa 96 giếng được làm bằng polycarbonate, do colistin tích điện dương có thể bám vào thành của các đĩa nhựa được làm bằng polycarbonate, như vậy có thể làm giảm nồng độ của colistin trong thử nghiệm dẫn đến kết quả đề kháng giả. Một số nghiên cứu đánh giá độ chính xác của một số phương pháp xác định MIC colistin cho thấy các sản phẩm vi pha loãng đông khô thương mại, kết quả MIC có xu hướng cao hơn dẫn đến kết quả kháng sai. Ngược lại, các thử nghiệm E-test thường có MIC nhỏ, đặc biệt là ở dải giá trị MIC nhỏ có thể dẫn đến một kết quả nhạy cảm sai [117].

Giá trị MIC colistin không chỉ để xác định tính nhạy cảm hay đề kháng của vi khuẩn mà còn liên quan tới việc tính liều colistin trong điều trị. Nên một kết quả thử nghiệm chính xác là rất cần thiết và quan trọng. Năm 2016, hai tổ chức CLSI và EUCAST đã đưa ra một khuyến nghị chung đối với thử nghiệm xác định MIC của colistin. Kỹ thuật này cần được thực hiện bằng phương pháp vi pha loãng canh thang (broth microdilution) và có một số lưu ý: Phải sử dụng colistin sulphat (không sử dụng dẫn xuất colistin methanesulfonate); Khay thử nghiệm được làm bằng polystyren tiêu chuẩn, không được xử lý (not treated); không thêm polysorbate-80 hoặc bất kỳ chất hoạt động bề mặt (surfactants) nào khác; Các phương pháp thử nghiệm khác không được khuyến nghị, như: pha loãng kháng sinh trong thạch, kháng sinh khuếch tán đĩa và khuếch tán gradient (E-test) [165].

Chính vì vậy, ở nghiên cứu này, chúng thực hiện kỹ thuật xác định MIC colistin bằng phương pháp vi pha loãng trong môi trường lỏng theo hướng dẫn của CLSI [146], sử dụng colistin sulphat (Sigma, Mỹ) và được thực hiện

trên đĩa 96 tiêu chuẩn - Đáy tròn được làm bằng polypropylene và chưa được xử lý (not treated) (Hãng corning). Không sử dụng loại đĩa đã được xử lý (treated) (để sử dụng cho nuôi cấy tế bào) có thể cho kết quả đề kháng giả do kháng sinh colistin có thể bị dính vào bề mặt của giếng, làm giảm nồng độ colistin trong môi trường thử nghiệm.

Hơn nữa, ở nghiên cứu của chúng tôi, ngoài việc sử dụng các chủng chuẩn để kiểm soát chất lượng, như *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 28753 còn sử dụng thêm *E. coli* NCTC 13846 kháng colistin (MIC = 4 µg/ml). Vì khi phân tích các chủng *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 28753 với giới hạn tiêu chuẩn gồm bốn nồng độ pha loãng bậc hai (từ 0,25 - 2 µg/ml) (theo hướng dẫn của cả EUCAST và CLSI), sẽ cho phép sự dao động đáng kể về giá trị MIC của colistin. Khuyến cáo sử dụng thêm *E. coli* NCTC 13846 đề kháng colistin (MIC = 4 µg/ml) để kiểm tra chất lượng khi thử nghiệm xác định MIC của colistin. Kết quả đạt yêu cầu khi kết quả MIC nằm trong khoảng từ 2 - 8 µg/ml và > 80% số thử nghiệm có MIC = 4 µg/ml [147].

Trên lâm sàng, khi tính liều colistin sử dụng cho người bệnh, nồng độ Cđích được căn cứ trên giá trị MIC của colistin đối với chủng vi khuẩn thử nghiệm. Tuy nhiên, giá trị MIC thường có muộn do cần có thời gian nuôi cấy và định danh xác định vi khuẩn gây bệnh. Nên rất cần các thông tin về mức độ nhạy cảm của vi khuẩn, đặc biệt là giá trị MIC của colistin đối với các chủng *A. baumannii* lưu hành ở Việt Nam và ở từng đơn vị để có cơ sở tính liều sử dụng đối với colistin một cách hiệu quả, an toàn.

Một điều cần lưu ý là đề kháng colistin ở *A. baumannii* chủ yếu xảy ra trong quá trình trị liệu bằng colistin ở các chủng nhạy cảm với colistin trước đó [166],[167]. Theo kết quả nghiên cứu của Qureshi và CS, trên 20 bệnh nhân với *A. baumannii* kháng colistin đã được xác định sau khi điều trị viêm phổi liên quan đến thở máy và được sử dụng colistin tiêm tĩnh mạch và/khí

dung để điều trị nhiễm trùng do *A. baumannii* đề kháng carbapenem. Các chủng *A. baumannii* được phân lập từ cùng 1 bệnh nhân được thử nghiệm có kết quả nhạy cảm với colistin trước khi được xác định đề kháng colistin và các chủng này có mối liên hệ kiểu gen PFGE cao và chúng thuộc về dòng quốc tế II (International clone II - dòng đang gây dịch trên toàn thế giới) [166].

Nhiều nghiên cứu cho thấy đột biến đề kháng colistin có thể dễ dàng xảy ra ở *A. baumannii*, *P. aeruginosa* và *K. pneumoniae* ra khi điều trị bằng colistin [168],[169]. Thử nghiệm nồng độ ngừa đột biến (mutant prevention concentration - MPC) của colistin đối với *A. baumannii* - MPC₉₀ > 128 mg/l, cao hơn nhiều so với nồng độ colistin trong huyết tương ở liều khuyến cáo điều trị [170]. Như vậy, không thể ngăn chặn sự xuất hiện các chủng đề kháng colistin trên lâm sàng.

Tuy nhiên, theo nhiều nghiên cứu các chủng đột biến kháng colistin có độc lực thấp hơn và trở nên nhạy cảm hơn với một số kháng sinh khác [171],[172],[173]. Khi *A. baumannii* kháng colistin, một số yếu tố quy định độc lực của vi khuẩn này bị giảm sút, như: giảm sự hình thành màng sinh học, giảm protein màng ngoài CarO và giảm protein có vai trò chống oxy hóa (có thể bảo vệ vi khuẩn khỏi các tác động của ROS (reactive oxygen species) do đại thực bào tạo ra, giảm khả năng gây nhiễm trùng xâm lấn...[171]. Theo nghiên cứu của García-Quintanilla và CS, các chủng kháng colistin lại gia tăng đáng kể độ nhạy cảm (16 lần) đối với các kháng sinh như azithromycin, rifampicin, vancomycin và tăng nhạy cảm vừa phải với amikacin, ceftazidime, imipenem, cefepime và meropenem [172]. Như vậy, trong quá trình điều trị nhiễm khuẩn do bằng colistin cần một liệu pháp phối hợp colistin với các kháng sinh khác. Một số liệu pháp phối hợp kháng sinh như colistin/rifampicin hoặc colistin/imipenem có tác dụng hiệp đồng trong điều trị nhiễm khuẩn do *A. baumannii* [174],[175]. Những kết quả trên có thể giải

thích về tỷ lệ kháng colistin thấp và không phổ biến ở *A. baumannii* trong môi trường lâm sàng mặc dù khả năng kháng colistin rất dễ xảy ra khi sử dụng colistin để điều trị nhiễm khuẩn do *A. baumannii* [173].

4.2. PHÁT HIỆN MỘT SỐ GEN MÃ HÓA CARBAPENEMASE LỚP D, B Ở *ACINETOBACTER BAUMANNII*

4.2.1. PCR xác định một số gen mã hóa carbapenemase lớp D, B

Trong 144 chủng *A. baumannii*, 79,9% mang gen *bla*_{OXA-23-like}, gen *bla*_{OXA-58-like} và *bla*_{NDM-1} chiếm tỷ lệ thấp (5,6% và 6,3%), 80,6% có *ISAbal* và 86,9% số chủng mang gen *bla*_{OXA-23-like} có *ISAbal* ở vùng trước của gen *bla*_{OXA-23-like} (*ISAbal/bla*_{OXA-23-like}). Không xác định được chủng nào mang gen *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM} (biểu đồ 3.8).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như đối với nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước khác, các gen *bla*_{OXA} và đặc biệt là *bla*_{OXA-23-like} là những gen mã hóa carbapenemase phổ biến nhất ở *A. baumannii* trên toàn thế giới [9],[10].

Mặc dù, như đã phân tích ở trên liên quan đến phương pháp chọn mẫu nên tỷ lệ các gen có thể cũng không phản ánh đúng thực tế, nhưng ở một số nghiên cứu khác gần đây ở Việt Nam, tỷ lệ *A. baumannii* mang gen *bla*_{OXA-23-like} cũng rất cao 80% (tại 3 bệnh viện ở miền Nam năm 2012-2014) [20], 85,3% (Bệnh viện Trung ương Huế và Bệnh viện Đại học Y Huế, năm 2017) [21]. Đặc biệt nghiêm trọng, khi 91,6% số chủng *A. baumannii* gây viêm phổi thở máy ở bệnh nhân nhi mang *bla*_{OXA-23-like} [115]. Hiện nay, tỷ lệ này cao hơn khá nhiều so với nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Hà trên các chủng *A.baumannii* gây nhiễm khuẩn huyết tại 7 bệnh viện ở 3 miền của Việt Nam năm 2011-2012 (57,1%) [19].

Ngoại trừ *bla*_{OXA-51-like} (là gen nội tại của *A. baumannii*), gen *bla*_{OXA-23-like} là gen thường gặp nhất ở tất cả các chủng *A. baumannii* kháng carbapenem

được xác định ở tất cả các lục địa trên toàn thế giới [8] và là gen mã hóa carbapenemase phổ biến nhất ở các chủng *A. baumannii* ở Châu Á, Thái Bình Dương [10]. OXA-23 là CHDL đầu tiên được báo cáo từ một chủng *A. baumannii* (năm 1985) [80]. Hiện nay, tỷ lệ gen *bla*_{OXA-23-like} thường luôn cao nhất và cao hơn nhiều so với các CHDL khác [81]. Có nghiên cứu còn cho thấy tỷ lệ *bla*_{OXA-23-like} cao > 95% ở các chủng CRAB [22],[176]. Mặc dù rất thường gặp ở *A. baumannii* nhưng gen *bla*_{OXA-23-like} không có nguồn gốc từ loài này mà là gen được thu nhận. Poirel và CS đã đưa ra giả thuyết về gen *bla*_{OXA-23-like} có khả năng được huy động bởi IS*Aba1* từ *Acinetobacter radioresistens* sang *A. baumannii* [177]. Transposon và trình tự chèn IS có vai trò quan trọng trong sự lan truyền của các gen đề kháng kháng sinh và gen độc lực trong các loài vi khuẩn nói chung và *A. baumannii* nói riêng. Một số yếu tố IS, như IS*Aba1*, IS*Aba2*, IS*Aba3* và IS18 có vai trò quan trọng đối với khả năng đề kháng KS ở *A. baumannii*, đặc biệt là IS*Aba1* [70].

116 chủng (80,6%) mang trình tự chèn IS*Aba1*. Trong đó, chỉ 20,6% số chủng mang duy nhất gen *bla*_{OXA-51-like} dương tính với IS*Aba1*, nhưng có 95,6% các chủng mang gen *bla*_{OXA-23-like} dương tính với IS*Aba1*. Có 6 chủng mang *bla*_{OXA-58-like} hoặc *bla*_{NDM-1} không kết hợp với *bla*_{OXA-23-like} đều âm tính với IS*Aba1* (bảng 3.7). 86,9% các chủng mang gen *bla*_{OXA-23-like} có IS*Aba1* ở vùng trước của gen này (IS*Aba1*/*bla*_{OXA-23-like}). Như vậy, sự hiện diện của IS*Aba1* có mối liên quan nhiều hơn với *bla*_{OXA-23-like} ở các chủng *A. baumannii*.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với một số nghiên cứu trong và ngoài nước khác. IS*Aba1* thường được xác định ở *A. baumannii* với tỷ lệ cao [20],[66],[70]. Theo nghiên cứu của Nguyễn Tuấn Anh trên các chủng *A. baumannii* ở ba bệnh viện ở miền Nam (năm 2012-2014), 86,7% số chủng mang gen *bla*_{OXA-51-like} và *bla*_{OXA-23-like} dương tính với IS*Aba1* [20].

Tn2006, Tn2007 và Tn2008 được xác định là cấu trúc di truyền chứa gen này ở *A. baumannii* [8]. Tn2006 là một transposon hỗn hợp (có 2 trình tự chèn IS*Aba1* nằm ở trước (upstream) và sau (downstream) của *bla*_{OXA-23-like} (hình 1.4). Trong cùng một dòng vô tính (clone) của *A. baumannii*, Tn 2006 có ở các vị trí khác nhau (Nhiễm sắc thể hoặc plasmid), điều này cho thấy Tn2006 có thể là transposon thu nhận được hoặc là cấu trúc di động trong bộ gen có khả năng chuyển vị. Như vậy, IS*Aba1* có thể đóng góp cho sự lây lan của gen *bla*_{OXA-23-like} giữa các loài *Acinetobacter* khác nhau. Sự lây truyền của gen *bla*_{OXA-23-like} phức tạp và linh hoạt nên sẽ rất khó để kiểm soát [8]. Điều này có thể lý giải cho sự phổ biến của gen *bla*_{OXA-23-like} trên toàn thế giới.

Ngược lại với sự thường gặp của gen *bla*_{OXA-23-like}, chỉ có ở 5,6% số chủng *A. baumannii* mang gen *bla*_{OXA-58-like} và không có chủng nào được xác định mang gen *bla*_{OXA-24-like} (biểu đồ 3.8). Điều này cũng tương đồng với một số nghiên cứu khác trong nước [19],[23],[115]. Mặc dù gen *bla*_{OXA-58-like} được phân bố trên toàn cầu [84], nhưng *bla*_{OXA-58-like} không phổ biến như đối với *bla*_{OXA-23-like} có thể do gen *bla*_{OXA-58-like} nằm trên plasmid không tiếp hợp (nonconjugative plasmids) nên việc lan truyền gen này không được dễ dàng. Thường ở châu Âu tỷ lệ *bla*_{OXA-58-like} cao hơn ở các châu lục khác [85]. Mặc dù OXA-58 có hoạt tính thủy phân carbapenem yếu, tuy nhiên, ở *A. baumannii* thường phối hợp nhiều gen kháng carbapenem khác nhau nên cũng có thể làm tăng mức độ kháng thuốc. Trong nghiên cứu này, có 8 chủng *A. baumannii* mang gen *bla*_{OXA-58-like} thì có 6 chủng mang tổ hợp 3 gen: *bla*_{OXA-51-like} + *bla*_{OXA-23-like} + *bla*_{OXA-58-like} và *bla*_{OXA-51-like} + *bla*_{OXA-58-like} + *bla*_{NDM-1} (biểu đồ 3.9).

Trong 144 chủng, chỉ có 16,0% số chủng *A. baumannii* mang duy nhất gen *bla*_{OXA-51-like}, 76,4% số chủng mang hai gen, 7,6% số chủng mang tổ hợp 3 gen mã hóa carbapenemase. Tỷ lệ số chủng mang duy nhất *bla*_{OXA-51-like}

cũng tương tự (16,0% so với 16,2%) như kết quả nghiên cứu trên các chủng *A. baumannii* phân lập được từ bệnh nhân ở 3 bệnh viện thuộc miền Nam (năm 2012-2014) [20]. Nhưng tỷ lệ này đã thấp hơn (16,0% so với 32,8%) ở nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Hà (năm 2011-2012) [19]. Đặc biệt, có nghiên cứu cho thấy, không còn chủng nào mang duy nhất gen *bla*_{OXA-51-like} như kết quả nghiên cứu của Lê Xuân Ngọc trên các chủng *Acinetobacter spp.* gây viêm phổi thở máy tại bệnh viện Nhi trung ương (năm 2014-2015), 100% số chủng mang 2 gen mã hóa carbapenemsae [115]. Như vậy, các chủng *A. baumannii* có xu hướng ngày càng mang nhiều gen đề kháng kháng sinh hơn.

Trong nghiên cứu này, các chủng chỉ mang gen *bla*_{OXA-51-like} có tỷ lệ đề kháng với các KS thấp hơn nhiều so với các chủng có ≥ 2 gen mã hóa carbapenemase (với $p < 0,001$) (biểu đồ 3.11). Đối với các chủng CSAB, ngoài *bla*_{OXA-51-like}, chỉ có 8,3% số chủng mang *bla*_{OXA-58-like} và 20,8% có *ISAbal*. Ngược lại, ở nhóm CRAB, tỷ lệ các gen đều cao hơn hẳn so với nhóm nhạy cảm, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{NDM-1-like} và *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} chỉ có ở nhóm kháng kháng carbapenem (biểu đồ 3.10). Tuy nhiên, tỷ lệ các giá trị MIC của 2 loại kháng sinh IPM và MEM gần tương tự nhau giữa các chủng có hoặc không có *ISAbal/bla*_{OXA-23-like}. Riêng đối với DOR, nhóm chủng có *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} có tỷ lệ MIC ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ cao hơn so với nhóm chủng không có *ISAbal* ở trước gen *bla*_{OXA-23-like} (sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$) (biểu đồ 3.12). Điều này có thể được giải thích vì DOR bền hơn đối với một số loại carbapenemase so với IPM và MEM. Đối với chủng có *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} sẽ làm tăng mức độ biểu hiện của gen, dẫn đến đề kháng ở mức độ cao hơn.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi, ngoài các CHDL, thì *bla*_{NDM-1} là một loại MBL duy nhất được phát hiện nhưng với tỷ lệ không cao (9/144, 6,3%).

Sự phân bố trên toàn thế giới của các chủng dương tính với *bla*_{NDM} dường như không đồng nhất với tỷ lệ chủng mang gen này. Theo kết quả của một số chương trình giám sát toàn cầu nghiên cứu xu hướng đề kháng kháng sinh - SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends) cho thấy tỷ lệ chủng vi khuẩn mang *bla*_{NDM} không cao. Tại Trung Quốc, một nghiên cứu trên 1.162 chủng *Enterobacteriaceae* và *Acinetobacter spp.* phân lập được trên lâm sàng tại nhiều địa điểm báo cáo có 3,9% là dương tính với *bla*_{NDM} [178].

Mặc dù tỷ lệ *bla*_{NDM-1} không cao nhưng các chủng mang gen *bla*_{NDM-1} được phân bố ở 6 bệnh viện thuộc cả 3 vùng miền của Việt Nam. Ngoài các bệnh viện tuyến trung ương, một số bệnh viện tuyến tỉnh cũng đã xuất hiện các chủng *A. baumannii* mang gen *bla*_{NDM-1}. Tuy nhiên, tỷ lệ *A. baumannii* mang gen *bla*_{NDM-1} ở các bệnh viện tuyến trung ương cao hơn so với bệnh viện tuyến tỉnh (9,6% so với 1,1%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$) (biểu đồ 3.12).

Sự có mặt của vi khuẩn mang gen *bla*_{NDM-1} tại các bệnh viện lớn có thể liên quan đến việc gia tăng mức độ sử dụng kháng sinh nhóm carbapenem. Mặc dù, mức độ sử dụng kháng sinh carbapenem ở bệnh viện tuyến tỉnh thường thấp hơn các tuyến trung ương, nhưng vấn đề chuyển tuyến điều trị giữa các bệnh viện tuyến dưới lên tuyến trên và ngược lại là một trong những nguy cơ lan truyền các chủng vi khuẩn mang các gen đề kháng kháng sinh trong đó có thể có *bla*_{NDM-1}. Do vậy, chúng tôi thực hiện kỹ thuật PFGE để xác định các chủng nghiên cứu có mối liên hệ về kiểu gen hay không.

4.2.2. Mối liên hệ kiểu gen PFGE và kiểu hình đề kháng kháng sinh của các chủng *A. baumannii*

Kết quả phân tích PFGE của 144 chủng *A. baumannii* phân lập ở 9 bệnh viện, cho thấy hệ số tương đồng của các loại PFGE dao động từ 25-100%. Trong đó, xác định được 26 cụm (gồm 96 chủng, 66,7%) có độ tương

đồng $\geq 80\%$ về kiểu gen PFGE. 12 cụm có số chủng nhỏ nhất (gồm 2 chủng/cụm), cụm X có số lượng chủng lớn nhất (12 chủng) (hình 3.10).

Trong các cụm có sự tương đồng về kiểu gen, có cụm chỉ bao gồm các chủng được phân lập từ cùng một bệnh viện. Hạn chế của nghiên cứu là không có thông tin về địa điểm phân lập (khoa điều trị) của chủng nghiên cứu nên không phân tích được vấn đề lây nhiễm trong cùng một khoa hay giữa các khoa của mỗi bệnh viện. Tuy nhiên, đã có những nghiên cứu chứng minh có sự lây nhiễm chéo các chủng *A. baumannii* giữa các bệnh nhân trong cùng một khoa và giữa các khoa phòng trong cùng một bệnh viện ở Việt Nam [22]. Một nghiên cứu tại Tây Ban Nha, đã phân lập được các chủng *A. baumannii* ở hai đợt nhiễm khuẩn khác nhau (năm 2001 và 2006) ở cùng một bệnh viện thuộc cùng một loại PFGE, cho thấy có sự tồn tại dai dẳng của các chủng *A. baumannii* trong môi trường bệnh viện, đây là nguy cơ để bùng phát nhiễm khuẩn trong bệnh viện [151].

Ngoài những cụm có sự tương đồng về kiểu gen thuộc một bệnh viện, cũng có những cụm gồm các chủng từ các bệnh viện khác nhau viện trong cùng một vùng miền và giữa các vùng miền khác nhau (miền Bắc – miền Trung – miền Nam) (cụm X, XII, XIV). Đặc biệt, cụm XI với 2 nhánh có kiểu gen PFGE tương đồng 100%, đều mang 2 gen *bla*_{OXA-51-like} + *bla*_{OXA-23-like} và có kiểu hình đề kháng kháng sinh hoàn toàn giống nhau. Các chủng này được phân lập từ 3 bệnh viện trên cùng một địa bàn thành phố. Một bệnh viện thuộc tuyến trung ương và 2 bệnh viện thuộc tuyến thành phố. Được biết, những bệnh viện này thường xuyên có người bệnh được chuyển tuyến qua lại. Kết quả này cũng tương tự một số nghiên cứu. Khi nghiên cứu kiểu gen PFGE của 76 chủng *A. baumannii* gây nhiễm khuẩn huyết phân lập từ 6 bệnh viện ở 3 miền của Việt Nam (năm 2012-2013), có mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng trong cùng một bệnh viện và giữa các bệnh viện [121]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như kết quả của một số nghiên cứu

trong và ngoài nước khác [121],[151]. Với kết quả phân tích PFGE như trên cần có những nghiên cứu sâu hơn về kiểu gen (gonotyping) như phương pháp phân loại trình tự đa điểm (Multiple locus sequence typing-MLST) để xác định kiểu gen ST và mối liên quan dịch tễ học phân tử của các chủng *A. baumannii* ở Việt Nam và trên thế giới.

9 chủng *A. baumannii* mang gen bla_{NDM-1} trong nghiên cứu này không có liên quan chặt chẽ về kiểu gen (thuộc các clone khác nhau). Điều đó chứng tỏ sự đa dạng về mặt kiểu gen của những chủng *A. baumannii* mang gen bla_{NDM-1} kháng carbapenem phân lập tại các bệnh viện. Kết quả này cũng tương tự như một số nghiên cứu trong và ngoài nước [179]. Gen bla_{NDM-1} nằm trên cả plasmid và nhiễm sắc thể. Transposon Tn125 chứa gen bla_{NDM-1} nằm trên nhiễm sắc thể ở *A. baumannii* đã được chứng minh là phương tiện chính để phổ biến các gen bla_{NDM-1} trong loài này. Tính đa dạng của các đặc tính di truyền có thể giải thích hiện tượng tỷ lệ lây lan cao các chủng mang gen bla_{NDM-1} trên toàn thế giới. Trái ngược với sự đa dạng plasmid toàn cầu, nghiên cứu các chủng mang bla_{NDM-1} ở 1 bệnh viện thường do sự lan truyền của dòng vô tính [22],[179]. Tuy nhiên, do số lượng chủng của nghiên cứu này chưa đủ lớn nên chưa phát hiện mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng mang gen bla_{NDM-1} trong cùng một bệnh viện.

Khi phân tích về kiểu hình đề kháng kháng sinh ở các cụm có cùng kiểu gen cho thấy, các chủng này không có kiểu hình đề kháng kháng sinh giống nhau 100%. Với nguồn gen phong phú và dưới áp lực của chọn lọc tự nhiên, các chủng vi khuẩn ngày càng tiến hoá theo nhiều hướng có khả năng tích hợp nhiều gen kháng kháng sinh khác nhau thông qua các phương thức truyền gen ngang. Các phân tích di truyền cho thấy, *A. baumannii* có bộ gen mở (open pan genome) thuận lợi cho việc thu nhận các yếu tố di truyền mới trong đó có các gen độc lực và đề kháng kháng sinh. Đây là một trong những

điều kiện quan trọng để *A. baumannii* từ một mầm bệnh cơ hội trở thành mối đe dọa nghiêm trọng đối với sức khỏe con người [180].

Cụm XXV (hình 3.11A), gồm 2 chủng có cùng kiểu gen PFGE, thuộc cùng một bệnh viện nhưng có sự khác nhau hoàn toàn về kiểu hình kháng kháng sinh đối với 8/9 kháng sinh được thử nghiệm (trừ colistin). Có thể do một trong hai chủng này đã nhận được gen đề kháng qua truyền gen ngang từ các chủng vi khuẩn khác. Tương tự đối với cụm VIII (hình 3.11^a), gồm 2 chủng vi khuẩn được từ 2 bệnh viện khác nhau. Chủng được phân lập từ bệnh viện tuyến trung ương có kiểu hình đề kháng kháng sinh cao hơn hẳn so với chủng phân lập được từ bệnh viện tuyến tỉnh. Điều này cho thấy nhiều khả năng chủng có khả năng đề kháng cao được hình thành do áp lực chọn lọc tự nhiên từ việc sử dụng kháng sinh khác nhau ở các bệnh viện.

Giữa các chủng thuộc cùng 1 cụm kiểu gen thường chỉ có sự khác biệt nhiều về kiểu hình đề kháng kháng sinh với minocycline (15/26 cụm), còn đối với các kháng sinh khác ít có sự khác biệt (chỉ từ 3-5/26 cụm). Điều này có thể được lý giải do ở *A. baumannii* thường có các integron với nhiều băng gen (gen cassette) tạo thành mảng băng gen (gen cassette array) quy định tính đề kháng với nhiều loại kháng sinh. Các gen cassette array này có thể được chuyển toàn bộ từ vi khuẩn này sang các vi khuẩn khác qua truyền gen ngang. Nhiều integron với gen cassette array giống hệt nhau được tìm thấy ở các loài khác nhau từ các môi trường và vị trí địa lý khác nhau [181]. Nên kiểu hình đề kháng với một số loại kháng sinh ở các chủng vi khuẩn này thường khá giống nhau.

4.3. MỐI LIÊN QUAN GIỮA MIC VỚI SỰ XUẤT HIỆN CARBAPENEMASE VÀ GEN MÃ HÓA CARBAPENEMASE

Có nhiều phương pháp khác nhau để phát hiện carbapenemases. Tuy nhiên, độ nhạy, độ đặc hiệu của mỗi phương pháp rất khác nhau phụ thuộc vào loại vi khuẩn và loại carbapenemase [14],[15]. Hơn nữa, do tính thẩm nội

tại của màng ngoài ở *Acinetobacter* thấp [13] và hoạt tính enzyme của một số loại carbapenemase ở *Acinetobacter* yếu, nên phát hiện carbapenemase ở *Acinetobacter* được cho là khó hơn so với *Enterobacteriaceae* và *Pseudomonas spp* [14],[15]. Do đó, nghiên cứu này thực hiện 5 kỹ thuật phát hiện carbapenemase, tiêu chuẩn xác định 1 chủng sinh carbapenemase khi chủng đó cho kết quả dương tính với bất kỳ 1 trong 5 kỹ thuật này.

Trong 144 chủng *A. baumannii*, 84,0% số chủng có kết quả carbapenemase dương tính. Trong đó, kỹ thuật CIM có tỷ lệ dương tính với carbapenemase cao nhất (84,0%) và CIM dương tính với tất cả các chủng mà 4 kỹ thuật khác cho kết quả dương tính. Tiếp đến là kỹ thuật CarbAcineto NP và CarbAcineto NP cải tiến (2 kỹ thuật này cho kết quả hoàn toàn tương đồng nhau), tỷ lệ carbapenemase dương tính là 82,6% và cho kết quả dương tính nhanh (N) và rất rõ ràng (chuyển từ màu đỏ sang màu vàng) trong vòng 20 phút đối với chủng có mang bla_{NDM-1} . Kỹ thuật MTH cho tỷ lệ dương thấp nhất, trong đó, cả 7/7 chủng cho kết quả dương tính yếu (Y) (khó phân biệt kết quả dương tính/âm tính). Kỹ thuật THT, có tỷ lệ dương tính với carbapenemase (81,2%) cao hơn hẳn so với MTH (4,9%), tuy nhiên vẫn có một số chủng cho kết quả dương tính yếu (bảng 3.8).

Đối với các chủng *A. baumannii* có MIC của IPM ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$, chỉ có 2/24 (8,3%) số chủng dương tính với carbapenemase. Trong khi đó, các chủng có MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$, 119/120 (99,2%) số chủng dương tính với carbapenemase (sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$) (bảng 3.9). Tuy nhiên, tỷ lệ carbapenemase dương tính với từng kỹ thuật có sự khác nhau. CIM có tỷ lệ dương tính với carbapenemase cao nhất, tiếp đến là CarbAcineto NP và CarbAcineto NP cải tiến. Như vậy, đối với các chủng *A. baumannii* có MIC ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ với IPM thì nhiều khả năng đây là các chủng đề kháng carbapenem theo cơ chế sinh carbapenemase.

Kết quả nghiên cứu của tôi cũng tương đồng với nghiên cứu của Tamman và CS, khi nghiên cứu trên 199 chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* và *A. baumannii* kháng carbapenem, với giá trị MIC ngưỡng của meropenem hoặc imipenem là 8 µg/ml có độ nhạy gần 100% khi phát hiện sinh carbapenemase ở *P. aeruginosa* và *A. baumannii* [182].

Các chủng chỉ có gen *bla*_{OXA-51-like}, không có chủng nào dương tính với carbapenemase. Trong khi, 100% các chủng có gen *bla*_{OXA-23-like} và hoặc *bla*_{OXA-NDM-1} có MIC của IPM từ 8 - ≥ 64 µg/ml và dương tính với carbapenemase (bảng 3.10). Tuy nhiên, tỷ lệ carbapenemase dương tính khác nhau giữa các kỹ thuật. Đối với kỹ thuật CIM, 100% các chủng có ≥ 2 gen mã hóa carbapenemase dương tính với carbapenemase và là kỹ thuật duy nhất dương tính với cả 2 chủng mang gen *bla*_{OXA-51-like} + *bla*_{OXA-58-like}.

Gen *bla*_{OXA-51-like} nằm trên nhiễm sắc thể, là gen nội tại tự nhiên của *A. baumannii* và nó thường không dẫn đến kháng carbapenem trừ khi có một trình tự chèn - *ISAbal* được đưa vào khu vực promoter và gây quá biểu hiện của gen này [65]. Tuy nhiên, tỷ lệ *bla*_{OXA-51-like} có *ISAbal* thường thấp, nên các chủng chỉ có *bla*_{OXA-51-like} thường vẫn nhạy cảm với carbapenem [66],[81]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, có 06 chủng (26,1%) chỉ có duy nhất gen *bla*_{OXA-51-like} dương tính với *ISAbal*. Tuy nhiên, chúng tôi chưa xác định được sự hiện diện của *ISAbal* có đứng trước gen *bla*_{OXA-51-like} hay không. Một trong số 23 chủng này đề kháng với carbapenem (MIC = 8 µg/ml), trong khi các chủng còn lại đều vẫn nhạy cảm với kháng sinh này. Tuy chủng này có MIC = 8 µg/ml với carbapenem, nhưng không phát hiện được sinh carbapenemase qua cả 5 thử nghiệm. Điều này có thể do lượng carbapenemase thấp không đủ để phát hiện hoặc sự đề kháng carbapenem ở chủng này do các cơ chế khác không phải do carbapenemase. Trên thực tế, việc không phát hiện được carbapenemase ở các chủng chỉ có *bla*_{OXA-51-like} lại rất hữu dụng. Vì các cơ

chế đề kháng do các gen mã hóa nằm trên nhiễm sắc thể không thể chuyển gen ngang cho các vi khuẩn khác, nên đây là một vấn đề lâm sàng ít quan trọng. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Dortet và CS, kể cả với chủng *A. baumannii* có IS*Aba1* có đứng trước gen *bla*_{OXA-51-like} thì thử nghiệm sinh carbapenemase cũng cho kết quả âm tính [14].

Ngược lại với *bla*_{OXA-51-like}, 100% các chủng có gen *bla*_{OXA-23-like} đều kháng carbapenem, đặc biệt khi có phối hợp 2 gen *bla*_{OXA-23-like} + *bla*_{NDM-1} (5/5, 100% số chủng có MIC \geq 64 μ g/ml đối với carbapenem). Các chủng có *bla*_{NDM-1} cũng đều kháng carbapenem và khi kết hợp với các gen khác như *bla*_{OXA-23-like} và *bla*_{OXA-58-like} thì mức độ đề kháng carbapenem tăng (tỷ lệ MIC \geq 64 μ g/ml cao hơn) (bảng 3.11).

Tuy nhiên, có sự khác biệt về khả năng đề kháng carbapenem ở những chủng *A. baumannii* mang gen *bla*_{OXA-23-like} giữa các nghiên cứu [65],[66],[95],[97]. Một số nghiên cứu cho thấy, việc sản xuất OXA-23 ở *A. baumannii* là đủ để tạo ra sự đề kháng với carbapenem [95],[97]. Nghiên cứu nhân gen *bla*_{OXA-23} và chuyển vào dòng *A. baumannii* ATCC 17978 nhạy cảm với carbapenem. Kết quả, dòng lai *A. baumannii* ATCC 17978 với sản xuất OXA-23 đã đề kháng với cả 4 loại carbapenem (tăng giá trị MIC của imipenem và meropenem gấp 128 lần và của doripenem và ertapenem 64 lần (khi đó MIC của IPM, MEM, DOR lần lượt là 16 μ g/ml, 64 μ g/ml, 32 μ g/ml). Các giá trị MIC này đều xác định là kháng với carbapenem [95]. Và khi gen *bla*_{OXA-23-like} được ghép vào chủng *A. baumannii* có hệ thống bơm đẩy kháng sinh AdeABC, MIC tăng lên $>$ 32 μ g/ml đối với imipenem [97].

Tuy nhiên, theo kết quả của một số nghiên cứu khác cho thấy, các chủng có IS*Aba1* ở trước gen *bla*_{OXA-23-like} (IS*Aba1*/*bla*_{OXA-23-like}) mới có tính đề kháng với carbapenem, trong khi những chủng không có IS*Aba1* ở trước gen *bla*_{OXA-23-like} vẫn biểu hiện nhạy cảm với carbapenem [65],[66]. Vai trò

của *ISAbal* cũng đã được chứng minh là làm tăng biểu hiện của *bla*_{OXA-23-like} khi chúng đứng ở vùng trước của gen này, các chủng *A. baumannii* với plasmid mang *bla*_{OXA-23-like} tự nhiên có mức độ kháng carbapenem cao hơn so với các biến thể của *A. baumannii* với plasmid tái tổ hợp pOXA-23 [83].

Ở Việt Nam, theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Hà trên các chủng *A. baumannii* gây nhiễm khuẩn huyết năm 2011-2012, 2/40 (5,0%) số chủng mang *bla*_{OXA-51-like} + *bla*_{OXA-23-like} có MIC của carbapenem < 2 µg/ml (nhạy cảm với carbapenem) và 82,2% các chủng có giá trị MIC của carbapenem từ 4-16 µg/ml [19]. Trong khi kết quả nghiên cứu của chúng tôi, tất cả các chủng có gen *bla*_{OXA-23-like} đều đề kháng với cả 3 kháng sinh carbapenem và không có sự khác biệt về mức độ đề kháng với IPM và MEM giữa 2 nhóm *A. baumannii* có và không có *ISAbal/bla*_{OXA-23-like}. Ngoại trừ đối với DOR, nhóm các chủng có *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} có tỷ lệ MIC ≥ 64 µg/ml cao hơn ở nhóm có *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} (với $p < 0,05$) (biểu đồ 3.12). Kết quả của chúng tôi cũng tương đồng như một nghiên cứu trong nước của Nguyễn Tuấn Anh, nghiên cứu 160 chủng *A. baumannii* phân lập được từ 3 bệnh viện ở miền Nam, tất cả các chủng mang gen *bla*_{OXA-51-like} + *bla*_{OXA-23-like} đều biểu hiện đề kháng với carbapenem ở mức cao cho dù có hoặc không có *ISAbal* [20]. Tương tự, nghiên cứu của Martinnerz và CS, các chủng mang *bla*_{OXA-23-like} có hoặc không có *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} đều đề kháng với carbapenem [183].

Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, các chủng dương tính với 2 gen *bla*_{OXA-51-like} + *bla*_{OXA-23-like} có các giá trị MIC với carbapenem khá khác nhau (dao động từ 8 - > 64 µg/ml). Như vậy, rất có thể ngoài *bla*_{OXA-23-like}, các chủng *A. baumannii* này còn kết hợp với các cơ chế đề kháng carbapenem khác hoặc đã có sự tăng số lượng bản sao các gen đề kháng dẫn đến tăng mức độ đề kháng.

Hơn nữa, hiện nay, đã phát hiện được 19 biến thể thuộc phân nhóm *bla*_{OXA-23-like} có khả năng thủy phân được carbapenem nhưng với mức độ khác nhau [9]. Trong đó, OXA-146 là một biến thể của OXA-23, khác với enzyme OXA-23 chỉ duy nhất một axit amin, nhưng OXA-146 lại có thể liên kết và thủy phân ceftazidime mang lại giá trị MIC “kháng” đối với ceftazidime. OXA-146 cũng thủy phân aztreonam, cefotaxime, ceftriaxone và ampicillin với hiệu quả cao hơn OXA-23 và vẫn bảo tồn hoạt động thủy phân carbapenem [92]. Trong hầu hết các nghiên cứu, thường sử dụng các cặp môi để phát hiện *bla*_{OXA-23-like} có thể phát hiện được các biến thể của phân nhóm này. Như vậy đối với các chủng PCR dương tính với *bla*_{OXA-23-like} có thể mang các *bla*_{OXA} khác cùng phân nhóm với *bla*_{OXA-23} nên có mức độ đề kháng có sự khác nhau. Liệu chẳng các chủng *A. baumannii* có mức độ đề kháng cao có thể mang nhiều hơn 1 loại *bla*_{OXA-23-like}.

Như vậy, một vi khuẩn có thể mang rất nhiều yếu tố phối hợp trong việc đề kháng với kháng sinh, trong khi một nghiên cứu không thể đánh giá hết được các yếu tố đó, điều này có thể giải thích một phần về sự khác biệt giữa các kết quả nghiên cứu về khả năng đề kháng đối với carbapenem ở các chủng *A. baumannii* mang gen *bla*_{OXA-23-like}. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu đều cho thấy, đề kháng carbapenem ở *A. baumannii* liên quan chủ yếu đến *bla*_{OXA-23-like} [8],[20].

Mặc dù OXA-23 có hoạt tính thủy phân mạnh đối với carbapenem nhưng lại không thủy phân được các cephalosporin phổ rộng do sự hiện diện của “cầu kỵ nước” ở vị trí hoạt động của enzym [92]. Nhưng trong nghiên cứu của chúng tôi, trong số các chủng đề kháng carbapenem chỉ có 01 chủng còn biểu hiện nhạy cảm với CAZ và CPM. Như vậy, các chủng *A. baumannii* này còn có các cơ chế đề kháng khác quy định tính đề kháng đối với các cephalosporin phổ rộng.

ADC-33 là một loại enzyme cephalosporinase phổ rộng được mã hóa bởi gen *bla*_{AmpC} ở *A. baumannii* có khả năng thủy phân mạnh đối với các cephalosporin phổ rộng (ceftazidime, cefepime) và monobactam [184]. Đề kháng với cephalosporin phổ rộng thường liên quan đến việc sản xuất quá mức gen này do được liên kết với trình tự chèn *ISAbal* cung cấp một trình khởi động mạnh [185].

Gen *bla*_{NDM-1} ngày càng được phát hiện ở các chủng *A. baumannii* trên toàn thế giới. Trong nghiên cứu của chúng tôi, 9 chủng *A. baumannii* mang gen *bla*_{NDM-1}, với các tổ hợp gen *bla*_{OXA-51-like} + *bla*_{NDM-1} (2 chủng), *bla*_{OXA-51-like} + *bla*_{OXA-23-like} + *bla*_{NDM-1} (5 chủng), *bla*_{OXA-51-like} + *bla*_{OXA-58-like} + *bla*_{NDM-1} (2 chủng). Tất cả các chủng này đều đề kháng với carbapenem với MIC từ 32 - >64 µg/ml và 100% được phát hiện sinh carbapenemase bởi 4 kỹ thuật (ngoại trừ kỹ thuật MHT cho kết quả dương tính yếu, không rõ ràng) (bảng 3.11).

Enzym NDM-1 có khả năng thủy phân mạnh và rộng đối với tất cả các kháng sinh beta-lactam (ngoại trừ monobactam) [111]. Ở *Acinetobacter*, *bla*_{NDM-1} thường nằm trong transposon hỗn hợp Tn125 với trình tự chèn *ISAbal25* ở 2 đầu của gen. Các chủng chứa gen *bla*_{NDM-1} có *ISAbal25* có MIC của các kháng sinh carbapenem cao hơn rất nhiều so với chủng không có *ISAbal25* [111].

Như vậy, kết quả nghiên cứu cho thấy có mối liên quan giữa giá trị MIC của carbapenem (≥ 8 µg/ml) với sự xuất hiện carbapenemase (qua thử nghiệm kiểu hình CIM, CarbAcineto NP và CarbAcineto NP cải tiến) và một số gen mã hóa carbapenemase (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{NDM-1}) thường gặp nhất ở các chủng *A. baumannii* phân lập tại Việt Nam.

Từ kết quả trên, có thể sử dụng 1 trong 3 phương pháp: phát hiện kiểu gen hoặc xác định MIC của carbapenem hoặc thử nghiệm sinh carbapenemase để xác định chủng *A. baumannii* có khả năng cao đề kháng với carbapenem

bằng cơ chế sinh carbapenemase. Điều này rất quan trọng trong việc phát hiện chủng vi khuẩn có sinh carbapenemase để có các biện pháp kiểm soát nhiễm khuẩn dự phòng lây nhiễm và lựa chọn kháng sinh thích hợp cho điều trị.

Có sự phù hợp rất cao giữa kiểu gen ($bla_{\text{OXA-23-like}}$ và $bla_{\text{NDM-1}}$) với hoạt động carbapenemase có thể phát hiện được bằng các kỹ thuật CIM, CarbAcineto NP, CarbAcineto NP cải tiến ở *A. baumannii*.

Đối với kỹ thuật MHT, có sự phù hợp rất thấp giữa kết quả kiểu gen và hoạt động carbapenemase. MHT chỉ cho kết quả dương tính yếu (rất khó phân biệt dương tính và âm tính) đối với các chủng mang $bla_{\text{OXA-51-like}} + bla_{\text{OXA-23-like}}$ và $bla_{\text{OXA-51-like}} + bla_{\text{OXA-23-like}} + bla_{\text{NDM-1}}$. Kết quả của chúng tôi tương tự kết quả nghiên cứu của Bonnin và CS, MHT chỉ dương tính yếu với 7,6% chủng *A. baumannii* có gen $bla_{\text{OXA-51-like}} + bla_{\text{OXA-23-like}} + bla_{\text{NDM-1}}$ [15],[133]. Theo nhiều nghiên cứu kỹ thật MHT phù hợp hơn với việc phát hiện carbapenemase nhóm A (như KPC) và nhóm D (như OXA-48) ở *Enterobacteriaceae* đây là các loại carbapenemase có hoạt tính thủy phân kháng sinh carbapenemase mạnh [186],[187]. Tuy nhiên, từ phiên bản thứ 28 của CLSI (năm 2018), không còn khuyến cáo sử dụng kỹ thuật MHT để phát hiện carbapenemase ở vi khuẩn [131].

Ở *A. baumannii*, màng ngoài có tính thấm thấp hơn khoảng 100 lần so với *E. coli* vì thiếu các porin lớn như OmpF và OmpC [13], hơn nữa NDM-1 là một lipoprotein gắn kết với màng ngoài vi khuẩn, điều này ngăn cản sự phát hiện hoạt động của carbapenemase ở *A. baumannii* bằng kỹ thuật MHT [188]. Thử nghiệm THT sử dụng Triton X-100 có khả năng hòa tan các protein màng ngoài của vi khuẩn, tăng giải phóng carbapenemase, đã làm tăng độ nhạy cho THT [133]. Kết quả của chúng tôi cho thấy THT có độ nhạy cao hơn hẳn so với kỹ thuật MHT, không chỉ đối với việc phát hiện NDM-1 mà còn với OXA-23. Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của Pasteran, F.

và CS (năm 2016), THT có thể phát hiện 97 - 99% các loại carbapenemase [133]. Tuy nhiên, đối với kỹ thuật THT, có một số chủng mang 2 gen mã hóa carbapenemase nhưng vẫn cho kết quả dương tính yếu (khó phân biệt dương tính/âm tính) với carbapenemase.

Thử nghiệm CarbAcineto NP và CIM đã phát hiện được nhiều hơn các chủng sinh carbapenemase thu được. Kỹ thuật CarbAcineto NP đã được sửa đổi so với kỹ thuật Carba NP ban đầu về điều kiện ly giải vi khuẩn và tăng số lượng vi khuẩn cần kiểm tra. Kỹ thuật CarbAcineto NP sử dụng NaCl 5M thay cho Tris HCl pH 7,4 (trong Carba NP) để tránh tác dụng đệm của Tris HCl do nhiều loại carbapenemase ở *A. baumannii* có hoạt tính thủy phân kháng sinh yếu nên lượng acid sinh ra không nhiều, khó có thể làm đổi màu chất chỉ thị. Thử nghiệm CarbAcineto NP có khả năng phát hiện các loại carbapenemase ở *Acinetobacter spp* với độ nhạy 94,7% và độ đặc hiệu 100% [14].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, kỹ thuật CarbAcineto NP (sử dụng bột imipenem monohydrate chuẩn) và CarbAcineto NP cải tiến (sử dụng bột kháng sinh tiêm Tienam) có khả năng phát hiện sinh carbapenemase như nhau. Kết quả của chúng tôi cũng tương tự như của Dortet và CS (năm 2014), CarbAcineto NP dương tính 100% với chủng có OXA-23, OXA-58, OXA-40, OXA-143, NDM-1, IMP, SIM, VIM (chỉ âm tính với chủng mang gen GES) [14]. Đặc biệt, với các chủng có gen *bla*_{NDM-1} cho kết quả dương tính rõ và nhanh (chuyển màu từ đỏ sang vàng hoàn toàn) trong vòng 20-30 phút; chủng có gen *bla*_{OXA-51+bla}_{OXA-23}: dương tính (chuyển màu từ đỏ sang vàng cam) trong vòng 2 giờ; chủng có OXA-51+OXA-58: cho kết quả không xác định (chuyển màu từ đỏ sang đỏ cam) trong vòng 2 giờ. Kết quả nhanh từ 20 phút - 2 giờ so với 18-24 giờ (đối với MHT và THT và CIM), đây là ưu điểm của CarbAcineto NP. Tuy nhiên, hóa chất thực hiện xét nghiệm của kỹ thuật CarbAcineto NP và CarbAcineto NP cải tiến cần có quá trình chuẩn bị phức tạp hơn so với kỹ thuật THT, CIM.

Kỹ thuật CIM có khả năng phát hiện carbapenemase cao nhất (kể cả với chủng mang *bla*_{OXA-51-like}+*bla*_{OXA-58-like} với giá trị MIC của carbapenemse ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$). Kỹ thuật CIM trong nghiên cứu của tôi đã có sự điều chỉnh so với kỹ thuật CIM khởi điểm của Zwaluw [134] và mCIM theo hướng dẫn của CLSI [131] như sau:

Điều chỉnh	CIM của Zwaluw [134]	mCIM theo CLSI [131]	CIM ở nghiên cứu này
Môi trường ủ huyền dịch vi khuẩn và khoanh giấy KS meropenem	Nước	TSB	Canh thang MH
Số lượng môi trường	400 μl	2 ml	400 μl
Thời gian ủ lần 1	2 giờ	4 giờ	4 giờ

Lý do cho sự điều chỉnh trong kỹ thuật CIM ở nghiên cứu của tôi xuất phát từ kết quả của một nghiên cứu cho thấy loại và số lượng môi trường cũng như thời gian ủ lần 1 có ảnh hưởng đến sự ổn định của meropenem trong khoanh giấy. Thử nghiệm đạt được kết quả tối ưu khi thay 2 ml dung dịch TSB ở kỹ thuật mCIM bằng 400 μl TSB và tăng số lượng chủng vi khuẩn cần kiểm tra thì độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật CIM đều là 100% đối với việc phát hiện carbapenemase ở *A. baumannii* [135]. Tuy nhiên trong nghiên cứu của tôi, không sử dụng TSB mà sử dụng dung dịch canh thang MH - là môi trường thích hợp để thực hiện kỹ thuật xác định tính nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn.

Kỹ thuật CIM với chi phí thấp, dễ thực hiện do có thể sử dụng các vật dụng rất thường có ở các phòng xét nghiệm vi sinh, nên dễ dàng áp dụng được ở các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng. Tuy nhiên, thời gian có kết quả chậm hơn so kỹ thuật CarbAcineto NP (24 giờ so với 2 giờ).

Như vậy, có sự phù hợp cao trong việc phát hiện vi khuẩn sinh carbapenemase của các kỹ thuật CIM (100%), CarbAcineto NP và CarbAcineto NP cải tiến (99,1%) với kết quả kiểu gen thường gặp (*bla*_{OXA-23-like} và *bla*_{NDM-1}) ở quần thể chủng *A. baumannii* lưu hành ở Việt Nam. Các kỹ thuật này có thể dễ dàng thực hiện ở các phòng xét nghiệm lâm sàng phù hợp với điều kiện Việt Nam, cung cấp một giải pháp hiệu quả góp phần vào việc quản lý các chủng *A. baumannii* sinh carbapenemase.

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu 144 chủng *A. baumannii* phân lập trên bệnh nhân tại 9 bệnh viện ở 3 miền của Việt Nam năm 2016, rút ra một số kết luận sau:

1. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của carbapenem với các chủng *A. baumannii*

83,3% *A. baumannii* đề kháng với cả 3 loại carbapenem (IPM, MEM, DOR), MIC₅₀ là 32 - 64 µg/ml và MIC₉₀ ≥ 64 µg/ml. Tuy nhiên, MIC của DOR thấp hơn so với IPM và MEM.

Các chủng nhạy cảm với carbapenem, có MIC của carbapenem ≤ 0,5 µg/ml là chủ yếu và còn nhạy cảm khá tốt với một số kháng sinh CPM, CAZ, AK, LEV, MI; Các chủng đề kháng với CRAB, có MIC = 32-64 µg/ml chiếm tỷ lệ cao và cũng đề kháng với các kháng sinh khác với giá trị MIC cao.

2. Một số gen mã hóa carbapenemase lớp D, B của các chủng *A. baumannii*

*bla*_{OXA-23-like} (79,9%) là gen mã hóa carbapenemase lớp D thường gặp nhất; *bla*_{NDM-1} (6,3%) là gen duy nhất thuộc nhóm B được xác định. Các gen này đều có ở các chủng *A. baumannii* phân lập tại các bệnh viện thuộc 3 miền với tỷ lệ gần tương tự nhau.

86,9% các chủng có IS*Aba1* ở vùng trước của gen *bla*_{OXA-23-like}.

A. baumannii có kiểu gen PFGE đa dạng, có sự tồn tại đơn dòng và đa dòng trong 1 bệnh viện và giữa các bệnh viện thuộc các vùng miền khác nhau ở Việt Nam. Kiểu hình đề kháng kháng sinh của các chủng thuộc cùng một cụm kiểu gen PFGE không giống nhau hoàn toàn.

3. Mối liên quan giữa MIC với sự xuất hiện carbapenemase và gen mã hóa carbapenemase

Có mối liên quan giữa MIC của carbapenem (≥ 8 µg/ml) với sự xuất hiện carbapenemase (qua thử nghiệm kiểu hình: CIM, CarbaAcineto NP, CarbaAcineto NP cải tiến) và một số gen mã hóa carbapenemase (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{NDM-1}) ở các chủng *A. baumannii*.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Đây là nghiên cứu đầu tiên xác định có mối liên quan giữa kiểu hình đề kháng carbapenem ($MIC \geq 8 \mu\text{g/ml}$) với kiểu gen ($bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{NDM-1}}$) và khả năng sinh enzym carbapenemase (qua thử nghiệm kiểu hình: bất hoạt carbapenem-Carbapenem Inactivation Method – CIM, CarbaAcineto NP, CarbaAcineto NP cải tiến) trên các chủng *A. baumannii* lưu hành tại Việt Nam. Từ đó đưa ra khuyến cáo về kỹ thuật phù hợp cho việc sàng lọc các chủng *A. baumannii* sinh carbapenemase ở các phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng.

2. Xác định mối liên hệ kiểu gen PFGE và kiểu hình đề kháng kháng sinh của các chủng *A. baumannii* thuộc cùng cụm kiểu gen (clone) là cơ sở khoa học cung cấp thêm các thông tin hữu ích về nguồn gốc, sự lây lan và khả năng tích hợp gen đề kháng kháng sinh khác nhau thông qua các phương thức truyền gen ngang của các chủng *A. baumannii* lưu hành ở Việt Nam.

KIẾN NGHỊ VỀ NHỮNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

1. Trong khuôn khổ nghiên cứu của luận án này không đủ điều kiện để thực hiện được với số lượng mẫu đại diện cho tất cả các chủng *A. baumannii* lưu hành ở Việt Nam. Nên có những nghiên cứu tiếp theo với số lượng mẫu lớn và trên phạm vi rộng hơn để có những kết luận xác thực hơn.

Thử nghiệm CarbAcineto NP, CarbAcineto NP cải tiến và CIM phát hiện vi khuẩn sinh carbapenemase có sự phù hợp cao với kết quả kiểu gen (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{NDM-1}) ở *A. baumannii*. Tuy nhiên, nên có những nghiên cứu với số lượng mẫu lớn và đại diện hơn để có thể lựa chọn được kỹ thuật phù hợp nhất trong việc phát hiện sinh carbapenemase trên các chủng *A. baumannii* lưu hành ở Việt Nam cung cấp một giải pháp hiệu quả góp phần vào việc quản lý các chủng vi khuẩn này.

2. Colistin là kháng sinh được lựa chọn cuối cùng để điều trị *A. baumannii* đa kháng. Giá trị MIC của colistin không chỉ để xác định tính nhạy/kháng của vi khuẩn với colistin mà còn giúp xác định liều colistin sử dụng trên lâm sàng để có hiệu quả điều trị tốt nhất cho người bệnh và hạn chế tình trạng kháng thuốc.

Nghiên cứu xác định giá trị MIC₉₀ của colistin là 0,5 µg/ml đối với các chủng *A. baumannii* (bằng phương pháp vi pha loãng trong môi trường lỏng - sử dụng phương pháp tiêu chuẩn - phương pháp duy nhất được khuyến cáo sử dụng để xác định MIC của colistin).

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Lưu Thị Vũ Nga, Phạm Hồng Nhung, Nguyễn Thị Lan Phương, Phạm Duy Thái, Nguyễn Vũ Trung và Trần Huy Hoàng (2017). Mối liên hệ kiểu gen của các chủng *Acinetobacter baumannii* mang gen NDM-1 phân lập trên bệnh nhân điều trị tại một số bệnh viện tuyến tỉnh và khu vực năm 2016. *Tạp chí Truyền nhiễm Việt Nam*, 4(20), 31-36.
2. Lưu Thị Vũ Nga, Phạm Hồng Nhung, Nguyễn Vũ Trung và Trần Huy Hoàng (2017). Khả năng phát hiện carbapenemase ở các chủng *Acinetobacter baumannii* của thử nghiệm Modified Hodge test, Triton Hodge test, CarbAcineto NP, CarbAcineto NP cải tiến”. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 1(461), 170-174.
3. Lưu Thị Vũ Nga, Phạm Hồng Nhung, Phạm Duy Thái, Nguyễn Vũ Trung và Trần Huy Hoàng (2019). Mối liên hệ kiểu gen và kiểu hình đề kháng kháng sinh của các chủng *Acinetobacter baumannii* phân lập từ một số bệnh viện ở Việt Nam năm 2016. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 2(484), 120-124.
4. Lưu Thị Vũ Nga, Phạm Hồng Nhung, Trần Thị Vân Phương, Phạm Duy Thái và Trần Huy Hoàng (2020). Mối liên quan giữa mức độ kháng carbapenem và sự xuất hiện gen mã hóa carbapenemase của các chủng *Acinetobacter baumannii* phân lập tại một số bệnh viện. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 5 (62), 1-5.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cerqueira, G.M. and A.Y. Peleg (2011). Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB life*, **63**(12): p. 1055-1060.
2. Elhosseiny, N.M. and A.S. Attia (2018). *Acinetobacter*: an emerging pathogen with a versatile secretome. *Emerging microbes & infections*, **7**(1): p. 1-15.
3. Bonell, A., et al. (2018). A systematic review and meta-analysis of ventilator-associated pneumonia in adults in Asia: an analysis of national income level on incidence and etiology. *Clinical Infectious Diseases*, **68**(3): p. 511-518.
4. WHO (2017) WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. *Available from:*
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>.
5. Meletis, G. (2016). Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic advances in infectious disease*, **3**(1): p. 15-21.
6. Nowak, P. and P. Paluchowska (2016). *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance—role of carbapenemases. *Folia histochemica et cytobiologica*, **54**(2): p. 61-74.
7. Abbott, I., et al. (2013). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. *Expert review of anti-infective therapy*, **11**(4): p. 395-409.
8. Mugnier, P.D., et al. (2010). Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerging infectious diseases*, **16**(1): p. 35.
9. Evans, B.A. and S.G. Amyes (2014). OXA β -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, **27**(2): p. 241-263.

10. Kamolovit, W., H.E. Sidjabat, and D.L. Paterson (2015). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance of *Acinetobacter* spp. in Asia and Oceania. *Microbial Drug Resistance*, **21**(4): p. 424-434.
11. Pagano, M., A.F. Martins, and A.L. Barth (2016). Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *brazilian journal of microbiology*, **47**(4): p. 785-792.
12. Goodman, K., et al. (2016). Infection control implications of heterogeneous resistance mechanisms in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). *Expert review of anti-infective therapy*, **14**(1): p. 95-108.
13. Sugawara, E. and H. Nikaido (2012). OmpA is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*, **194**(15): p. 4089-4096.
14. Dortet, L., et al. (2014). CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. *Journal of clinical microbiology*, **52**(7): p. 2359-2364.
15. Bonnin, R.A., et al. (2012). Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo- β -lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of clinical microbiology*, **50**(4): p. 1419-1421.
16. Phu, V.D., et al. (2016). Burden of hospital acquired infections and antimicrobial use in Vietnamese adult intensive care units. *PloS one*, **11**(1): p. e0147544.
17. Phạm Hồng Nhung, Đào Xuân Cơ, and Bùi Thị Hảo (2017). Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các trực khuẩn Gram âm phân lập tại khoa Điều trị tích cực Bệnh viện Bạch Mai. *Tạp chí Nghiên cứu y học*, **109**(4): p. 1-8.
18. Vũ Quỳnh Nga (2013). Đặc điểm nhiễm khuẩn *A. baumannii* ở bệnh nhân viêm phổi thở máy tại khoa Hồi sức cấp cứu Bệnh viện Chợ Rẫy. . *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **17**(1): p. 197-203.

19. Nguyễn Thị Thanh Hà, et al. (2013). Phát hiện gen Oxacillinase kháng carbapenem của *Acinetobacter baumannii* phân lập trên các bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết tại Việt Nam. *Tạp chí Y Dược lâm sàng*, **8**(4): p. 87-93.
20. Tuan Anh, N., et al. (2016). The molecular epidemiology and antimicrobial resistance phenotypes of *acinetobacter baumannii* isolated from patients in three hospitals in Southern Vietnam. *Journal of medical microbiology*, **66**.
21. Lê Nữ Xuân Thanh, et al. (2017). Đặc điểm gen mã hóa carbapenemase của các chủng *A. baumannii* kháng thuốc carbapenem. *Tạp chí Y dược học*, **5**(7): p. 52-57.
22. Tran, D.N., et al. (2017). Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 and other carbapenemase-producing *Acinetobacter calcoaceticus* - *baumannii* complex among patients in hospitals in Ha Noi, Viet Nam. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **36**(2): p. 219-225.
23. Hoang Quoc, C., et al. (2019). Carbapenemase genes and multidrug resistance of *Acinetobacter Baumannii*: A cross sectional study of patients with pneumonia in southern vietnam. *Antibiotics*, **8**(3): p. 148.
24. Papp-Wallace, K.M., et al. (2011). Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **55**(11): p. 4943-4960.
25. HASHIZUME, T., et al. (1984). Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *The Journal of antibiotics*, **37**(4): p. 394-400.
26. Kayser, F., et al. (1989). Activity of meropenem, against gram-positive bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **24**(suppl A): p. 101-112.
27. Gerischer, U. (2008). *Acinetobacter* molecular biology. *International microbiology*, **11**: p. 65-73.

28. Lessel, E. (1971). International Committee on Nomenclature of Bacteria Subcommittee on the Taxonomy of Moraxella and Allied Bacteria: Minutes of the Meeting, 11 August 1970. Room Constitution C, Maria-Isabel Hotel, Mexico City, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **21**(2): p. 213-214.
29. Visca, P., H. Seifert, and K.J. Towner (2011). Acinetobacter infection—an emerging threat to human health. *IUBMB life*, **63**(12): p. 1048-1054.
30. Bouvet, P. and P. Grimont (1987). Identification and biotyping of clinical isolates of Acinetobacter. in *Annales de l'Institut Pasteur/ Microbiologie*. Elsevier.
31. Fiester, S.E., et al. (2016). Iron-regulated phospholipase C activity contributes to the cytolytic activity and virulence of Acinetobacter baumannii. *PloS one*, **11**(11): p. e0167068.
32. Constantiniu, S., et al. (2004). Cultural and biochemical characteristics of Acinetobacter spp. strains isolated from hospital units. *The journal of preventive medicine*, **12**(3-4): p. 35-42.
33. Choi, C.H., et al. (2008). Acinetobacter baumannii invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC microbiology*, **8**(1): p. 216.
34. Lee, J.S., et al. (2010). Acinetobacter baumannii outer membrane protein A induces dendritic cell death through mitochondrial targeting. *The Journal of Microbiology*, **48**(3): p. 387-392.
35. Smani, Y., et al. (2014). Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of Acinetobacter baumannii. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **58**(3): p. 1806-1808.
36. Luke, N.R., et al. (2010). Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in Acinetobacter baumannii lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infection and immunity*, **78**(5): p. 2017-2023.

37. Iwashkiw, J.A., et al. (2012). Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. *PLoS pathogens*, **8**(6): p. e1002758.
38. Geisinger, E. and R.R. Isberg (2015). Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS pathogens*, **11**(2): p. e1004691.
39. Eijkelkamp, B.A., et al. (2011). Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC genomics*, **12**(1): p. 126.
40. Jacobs, A.C., et al. (2010). Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infection and immunity*, **78**(5): p. 1952-1962.
41. Eze, E.C., H.Y. Chenia, and M.E. El Zowalaty (2018). *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infection and drug resistance*, **11**: p. 2277.
42. Qi, L., et al. (2016). Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in microbiology*, **7**: p. 483.
43. Espinal, P., S. Marti, and J. Vila (2012). Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *Journal of Hospital Infection*, **80**(1): p. 56-60.
44. Hall, C.W. and T.-F. Mah (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, **41**(3): p. 276-301.
45. Turton, J.F., et al. (2010). Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. *Journal of clinical microbiology*, **48**(4): p. 1445-1449.

46. Chusri, S., et al. (2014). Clinical outcomes of hospital-acquired infection with *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **58**(7): p. 4172-4179.
47. Antunes, L., P. Visca, and K.J. Towner (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and disease*, **71**(3): p. 292-301.
48. Koulenti, D., et al. (2015). COPD patients with ventilator-associated pneumonia: implications for management. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **34**(12): p. 2403-2411.
49. Inchai, J., et al. (2015). Ventilator-associated pneumonia: epidemiology and prognostic indicators of 30-day mortality. *Japanese journal of infectious diseases*, **68**(3): p. 181-186.
50. Lee, Y.-T., et al. (2013). Bacteremic nosocomial pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis*: a single or two distinct clinical entities? *Clinical Microbiology and Infection*, **19**(7): p. 640-645.
51. Falagas, M., et al. (2007). Community-acquired *Acinetobacter* infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **26**(12): p. 857-868.
52. Chen, M.-Z., et al. (2001). Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *CHEST Journal*, **120**(4): p. 1072-1077.
53. Hawley, J.S., et al. (2007). Susceptibility of *Acinetobacter* strains isolated from deployed US military personnel. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **51**(1): p. 376-378.
54. Peleg, A.Y., et al. (2012). The success of *Acinetobacter* species; genetic, metabolic and virulence attributes. *PLoS One*, **7**(10): p. e46984.

55. Touchon, M., et al. (2014). The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome biology and evolution*, **6**(10): p. 2866-2882.
56. Hanberger, H., et al. (1999). Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. *Jama*, **281**(1): p. 67-71.
57. Xie, R., et al. (2018). Analysis of global prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infections disclosed a faster increase in OECD countries. *Emerging microbes & infections*, **7**(1): p. 1-10.
58. Nowak, J., et al. (2017). High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **72**(12): p. 3277-3282.
59. Trần Văn Ngọc, Phạm Thị Ngọc Thảo, and Trần Thị Thanh Nga (2017). Khảo sát đặc điểm kháng thuốc của *Pseudomonas aeruginosa* và *Acinetobacter baumannii* gây viêm phổi bệnh viện. *Thời sự Y học*, p. 64-69.
60. Ko, K.S., et al. (2007). High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **60**(5): p. 1163-1167.
61. Hejnar, P., M. Kolář, and V. Hájek (1999). Characteristics of acinetobacter strains (phenotype classification, antibiotic susceptibility and production of β -lactamases) isolated from haemocultures from patients at the teaching hospital in olomouc. *Biomedical Papers*,
62. Dobrewski, R., et al. (2006). Genotypic diversity and antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates in a Bulgarian hospital. *Clinical microbiology and infection*, **12**(11): p. 1135-1137.

63. Arroyo, L.A., et al. (2009). In vitro activities of tigecycline, minocycline, and colistin-tigecycline combination against multi- and pandrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* group. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **53**(3): p. 1295-1296.
64. Mahillon, J. and M. Chandler (1998). Insertion sequences. *Microbiology and molecular biology reviews*, **62**(3): p. 725-774.
65. Turton, J.F., et al. (2006). The role of IS Aba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS microbiology letters*, **258**(1): p. 72-77.
66. Kobs, V.C., et al. (2016). The role of the genetic elements bla_{oxa} and IS Aba 1 in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in carbapenem resistance in the hospital setting. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **49**(4): p. 433-440.
67. Gillings, M.R. (2014). Integrons: past, present, and future. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **78**(2): p. 257-277.
68. Gu, B., et al. (2007). Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. *Journal of clinical microbiology*, **45**(1): p. 241-243.
69. Fournier, P.-E., et al. (2006). Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS genetics*, **2**(1): p. e7.
70. Villalón, P., et al. (2012). Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- β -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**(3): p. 550-553.

71. Bush, K. and G.A. Jacoby (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **54**(3): p. 969-976.
72. Jeon, J.H., et al. (2015). Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *International journal of molecular sciences*, **16**(5): p. 9654-9692.
73. Docquier, J.-D., et al. (2003). On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **51**(2): p. 257-266.
74. Wright, G.D. (2011). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chemical communications*, **47**(14): p. 4055-4061.
75. Vallenet, D., et al. (2008). Comparative analysis of Acinetobacters: three genomes for three lifestyles. *PloS one*, **3**(3): p. e1805.
76. Brown, S. and S. Amyes (2005). The sequences of seven class D β -lactamases isolated from carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii from four continents. *Clinical microbiology and infection*, **11**(4): p. 326-329.
77. Turton, J.F., et al. (2006). Identification of Acinetobacter baumannii by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *Journal of clinical microbiology*, **44**(8): p. 2974-2976.
78. Wang, J., et al. (2014). Species distribution of clinical Acinetobacter isolates revealed by different identification techniques. *PloS one*, **9**(8): p. e104882.
79. Bernardis, A., et al. (1996). Evaluation of the ability of a commercial system to identify Acinetobacter genomic species. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **15**(4): p. 303-308.
80. Paton, R., et al. (1993). ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in Acinetobacter baumannii. *International journal of antimicrobial agents*, **2**(2): p. 81-87.

81. Elabd, F.M., et al. (2015). Molecular characterization of oxacillinases among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolates in a Saudi hospital. *Journal of infection and public health*, **8**(3): p. 242-247.
82. Sari, B., et al. (2015). Investigation of oxacillinase genes in nosocomial multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates by multiplex PCR and evaluation of their clonal relationship with Rep-PCR. *Mikrobiyoloji bulteni*, **49**(2): p. 249-258.
83. Poirel, L., et al. (2005). OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **49**(1): p. 202-208.
84. Coelho, J., et al. (2006). Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **50**(2): p. 756-758.
85. Marqué, S., et al. (2005). Regional occurrence of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *Journal of clinical microbiology*, **43**(9): p. 4885-4888.
86. Bou, G., A. Oliver, and J. Martínez-Beltrán (2000). OXA-24, a Novel Class D β -Lactamase with Carbapenemase Activity in an *Acinetobacter baumannii* Clinical Strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**(6): p. 1556-1561.
87. Merino, M., et al. (2010). OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **54**(6): p. 2724-2727.
88. Higgins, P.G., et al. (2009). OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **53**(12): p. 5035-5038.

89. Antonio, C.S., et al. (2011). High prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the bla OXA-143 gene in Brazilian hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **55**(3): p. 1322-1323.
90. Higgins, P.G., et al. (2013). OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **57**(5): p. 2121-2126.
91. Brown, S., H. Young, and S. Amyes (2005). Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clinical microbiology and infection*, **11**(1): p. 15-23.
92. Kaitany, K.-C.J., et al. (2013). Structures of the class D Carbapenemases OXA-23 and OXA-146: mechanistic basis of activity against carbapenems, extended-spectrum cephalosporins, and aztreonam. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **57**(10): p. 4848-4855.
93. Héritier, C., et al. (2003). Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **47**(1): p. 268-273.
94. Poirel, L., T. Naas, and P. Nordmann (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **54**(1): p. 24-38.
95. Smith, C.A., et al. (2013). Structural basis for carbapenemase activity of the OXA-23 β -lactamase from *Acinetobacter baumannii*. *Chemistry & biology*, **20**(9): p. 1107-1115.
96. Salimizand, H., et al. (2015). Prevalence of *Acinetobacter baumannii* harboring ISAbal/blaOXA-23-like family in a burn center. *Burns*, **41**(5): p. 1100-1106.

97. H eritier, C., et al. (2005). Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**(8): p. 3198-3202.
98. Afzal-Shah, M., N. Woodford, and D.M. Livermore (2001). Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **45**(2): p. 583-588.
99. Bonnin, R., et al. (2012). Dissemination of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, **18**(9): p. E362-E365.
100. Davoodi, S., et al. (2015). Detection of VIM-and IMP-type Metallo-Beta-Lactamase Genes in *Acinetobacter baumannii* Isolates from Patients in Two Hospitals in Tehran. *Iranian journal of biotechnology*, **13**(1): p. 63.
101. Jones, L.S., et al. (2014). Plasmid carriage of blaNDM-1 in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **58**(7): p. 4211-4213.
102. Khan, A.U., L. Maryam, and R. Zarrilli (2017). Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC microbiology*, **17**(1): p. 101.
103. Pfeifer, Y., et al. (2011). Molecular characterization of bla NDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **66**(9): p. 1998-2001.
104. Takahashi, A., et al. (2000). Detection of Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* in a Hospital. *Journal of clinical microbiology*, **38**(2): p. 526-529.

105. Tognim, M.C., et al. (2006). Dissemination of IMP-1 metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, **27**(7): p. 742-747.
106. Owlia, P., et al. (2012). ESBL-and MBL-mediated resistance in *Acinetobacter baumannii*: a global threat to burn patients. *Infez Med*, **20**(3): p. 182-7.
107. Castanheira, M., et al. (2004). Molecular characterization of a β -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **48**(12): p. 4654-4661.
108. Walsh, T.R. (2005). The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*, **11 Suppl 6**: p. 2-9.
109. Shahcheraghi, F., et al. (2011). Isolation and genetic characterization of metallo- β -lactamase and carbapenamase producing strains of *Acinetobacter baumannii* from patients at Tehran hospitals. *Iranian journal of microbiology*, **3**(2): p. 68.
110. Riccio, M.L., et al. (2000). Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of bla IMP allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **44**(5): p. 1229-1235.
111. Makena, A., et al. (2014). Biochemical characterization of New Delhi metallo- β -lactamase variants reveals differences in protein stability. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70**(2): p. 463-469.
112. Queenan, A.M. and K. Bush (2007). Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, **20**(3): p. 440-458.
113. King, D. and N. Strynadka (2011). Crystal structure of New Delhi metallo- β -lactamase reveals molecular basis for antibiotic resistance. *Protein Science*, **20**(9): p. 1484-1491.

114. Poirel, L., et al. (2012). Tn125-related acquisition of blaNDM-like genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **56**(2): p. 1087-1089.
115. Lê Xuân Ngọc, et al. (2016). Tình trạng kháng carbapenem và cephalosporin của *Acinetobacter*spp. mang gen oxacillinase ở bệnh nhi viêm phổi liên quan đến thở máy ngoài lứa tuổi sơ sinh tại Bệnh viện Nhi Trung ương, 2014-2015. *Tạp chí Y học dự phòng*, 2016. **13**(186): p. 103-108.
116. Trần Khánh Linh, et al. (2016). Phát hiện vi khuẩn kháng hầu hết các kháng sinh kể cả carbapenem và colistin tại một số bệnh viện thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí Y học dự phòng*, **XXVI**(7 (180)): p. 34.
117. Osei Sekyere, J. (2019). Mcr colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *MicrobiologyOpen*, **8**(4): p. e00682.
118. Li, H., et al. (2017). The Evaluation of Four In Vitro Susceptibility Testing Methods for Colistin on Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, **10**(9).
119. CLSI-EUCAST (2016). Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST *Polymyxin Breakpoints Working Group*.
120. Tran, H., et al. (2015). Common isolation of New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae in a large surgical hospital in Vietnam. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **34**(6): p. 1247-1254.
121. Nguyễn Thị Thanh Hà (2014). *Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng và vi sinh ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết do Acinetobacter baumannii năm 2011-2012*. Luận án tiến sĩ Y học, chuyên ngành Truyền nhiễm và các bệnh nhiệt đới, Viện nghiên cứu khoa học y dược lâm sàng 108.

122. Bialvaei, A.Z., et al. (2016). Current methods for the identification of carbapenemases. *Journal of Chemotherapy*, **28**(1): p. 1-19.
123. Poirel, L., et al. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, **70**(1): p. 119-123.
124. Woodford, N., et al. (2006). Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International journal of antimicrobial agents*, **27**(4): p. 351-353.
125. van der Zee, A., et al. (2014). Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC infectious diseases*, **14**(1): p. 27.
126. Sue, M.J., et al. (2014). Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis. *BioMed research international*.
127. Ambretti, S., et al. (2013). Evaluation of phenotypic and genotypic approaches for the detection of class A and class B carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Microbial Drug Resistance*, **19**(3): p. 212-215.
128. Dally, S., et al. (2013). DNA microarray for genotyping antibiotic resistance determinants in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **57**(10): p. 4761-4768.
129. CLSI (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing twenty- fifth Informational supplement M100-S27.
130. Shivaprasad, A., B. Antony, and P. Shenoy (2014). Comparative evaluation of four phenotypic tests for detection of metallo- β -lactamase and carbapenemase production in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, **8**(5): p. DC05.
131. CLSI (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing. *Twenty- eighth Informational supplement M100-S28*. Vol. 28th Edition.

132. González, L.J., et al. (2016). Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo- β -lactamase. *Nature chemical biology*, **12**(7): p. 516.
133. Pasteran, F., et al. (2016). Triton Hodge test: improved protocol for modified Hodge test for enhanced detection of NDM and other carbapenemase producers. *Journal of clinical microbiology*, **54**(3): p. 640-649.
134. Zwaluw, K., et al. (2015). The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods.
135. Vu, T.N., et al. (2020). Adjustment of Modified Carbapenem Inactivation Method Conditions for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii*. *Annals of laboratory medicine*, **40**(1): p. 21-26.
136. Lee, K., et al. (2003). Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of clinical microbiology*, **41**(10): p. 4623-4629.
137. Yong, D., et al. (2012). Evaluation of double-disk potentiation and disk potentiation tests using dipicolinic acid for detection of metallo- β -lactamase-producing *pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of clinical microbiology*, **50**(10): p. 3227-3232.
138. Walsh, T.R., et al. (2002). Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *Journal of clinical microbiology*, **40**(8): p. 2755-2759.
139. Bernabeu, S., L. Poirel, and P. Nordmann (2012). Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, **74**(1): p. 88-90.

140. Kempf, M., et al. (2012). Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One*, **7**(2): p. e31676.
141. Nordmann, P., L. Poirel, and L. Dortet (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*, **18**(9): p. 1503.
142. Dortet, L., L. Poirel, and P. Nordmann (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp. *Journal of clinical microbiology*, p. JCM. 01597-12.
143. CLSI (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing twenty- fifth Informational supplement M100-S25. Vol. 25th Edition.
144. Pasteran, F., et al. (2015). Simplified protocol for Carba NP Test for enhanced detection of carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *Journal of clinical microbiology*, **53**(12): p. 3908-3911.
145. Poirel, L. and P. Nordmann (2015). Rapidec Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producers. *Journal of clinical microbiology*, **53**(9): p. 3003-3008.
146. CLSI (2015). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Standard—Tenth. M-07-A10.
147. Matuschek, E., et al. (2018). Antimicrobial susceptibility testing of colistin—evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clinical Microbiology and Infection*, **24**(8): p. 865-870.
148. Segal, H., S. Garry, and B.G. Elisha (2005). Is IS ABA-1 customized for *Acinetobacter*? *FEMS microbiology letters*, **243**(2): p. 425-429.

149. Zhou, H., et al. (2007). Dissemination of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the ISAba1–blaOXA-23 genes in a Chinese hospital. *Journal of medical microbiology*, **56**(8): p. 1076-1080.
150. Durmaz, R., et al. (2009). The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn J Infect Dis*, **62**(5): p. 372-7.
151. Villalón, P., et al. (2011). Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *Journal of clinical microbiology*, **49**(3): p. 875-882.
152. Chuang, Y.-C., et al. (2011). Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, **52**(3): p. 352-360.
153. Vijayakumar, S., I. Biswas, and B. Veeraraghavan (2019). Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. *Future science OA*, **5**(7): p. FSO395.
154. Torres, A., et al. (2013). Risk factors for community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Thorax*, **68**(11): p. 1057-1065.
155. Jain, S., Self Wesley H., Wunderink Richard G., Fakhran S., Balk R. (2015). Bramley AM Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among US adults. *N Engl J Med*, **373**(5): p. 415-427.
156. Chen, T.-L., et al. (2010). Emergence and distribution of plasmids bearing the blaOXA-51-like gene with an upstream ISAba1 in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **54**(11): p. 4575-4581.
157. Lee, Y.-T., et al. (2012). Emergence of carbapenem-resistant non-*baumannii* species of *Acinetobacter* harboring a blaOXA-51-like gene that is intrinsic to *A. baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **56**(2): p. 1124-1127.

158. Kim, D.H., et al. (2013). Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 2 in Asia and AbaR-type resistance islands. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **57**(11): p. 5239-5246.
159. Walther-Rasmussen, J. and N. Høiby (2006). OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **57**(3): p. 373-383.
160. Queenan, A.M., et al. (2010). Hydrolysis and inhibition profiles of β -lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **54**(1): p. 565-569.
161. Magiorakos, A.P., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, **18**(3): p. 268-281.
162. Zavascki, A.P., et al. (2010). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert review of anti-infective therapy*, **8**(1): p. 71-93.
163. Chung, D.R., 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): p. 1409-1417.
164. Ngô Thị Hồng Phương, et al. (2013). Tình hình kháng kháng sinh của *Acinetobacter baumannii* phát hiện được tại Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí Khoa học ĐHSP TPHCM*, **47**: p. 112-118.
165. CLSI-EUCAST (2016). Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST *Polymyxin Breakpoints Working Group*.
166. Qureshi, Z.A., et al. (2015). Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. *Clinical infectious diseases*, **60**(9): p. 1295-1303.

167. Farshadzadeh, Z., et al. (2018). Growth rate and biofilm formation ability of clinical and laboratory-evolved colistin-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in microbiology*, **9**: p. 153.
168. Lee, J.-Y., et al. (2016). Preservation of acquired colistin resistance in gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **60**(1): p. 609-612.
169. Choi, M.-J. and K.S. Ko (2013). Mutant prevention concentrations of colistin for *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **69**(1): p. 275-277.
170. Cai, Y., et al. (2010). In vitro antimicrobial activity and mutant prevention concentration of colistin against *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **54**(9): p. 3998-3999.
171. Pournaras, S., et al. (2014). Growth retardation, reduced invasiveness, and impaired colistin-mediated cell death associated with colistin resistance development in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **58**(2): p. 828-832.
172. García-Quintanilla, M., et al. (2015). Lipopolysaccharide loss produces partial colistin dependence and collateral sensitivity to azithromycin, rifampicin and vancomycin in *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*, **46**(6): p. 696-702.
173. López-Rojas, R., et al. (2011). Impaired virulence and in vivo fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Infectious Diseases*, **203**(4): p. 545-548.
174. Rodriguez, C.H., et al. (2010). In vitro antimicrobials activity against endemic *Acinetobacter baumannii* multiresistant clones. *The Journal of Infection in Developing Countries*, **4**(03): p. 164-167.

175. Nguyễn Sĩ Tuấn (2019). *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*. Đại học Bách Khoa - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
176. Oliveira, E.A.d., et al. (2019). High rate of detection of OXA-23-producing *Acinetobacter* from two general hospitals in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **52**.
177. Poirel, L., et al. (2008). *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **52**(4): p. 1252-1256.
178. Hu, X., et al. (2017). Diversity of New Delhi metallo-beta-lactamase-producing bacteria in China. *International Journal of Infectious Diseases*, **55**: p. 92-95.
179. Phạm Duy Thái (2015). *Một số đặc tính của các chủng Acinetobacter baumannii gây nhiễm khuẩn bệnh viện mang gen NDM-1 kháng carbapenem*, *Chuyên ngành Vi sinh vật*. Đại học khoa học tự nhiên.
180. Labarca, J.A., et al. (2016). Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Critical reviews in microbiology*, **42**(2): p. 276-292.
181. Ellington, M.J., et al. (2006). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **59**(2): p. 321-322.
182. Tamma, P.D., et al. (2017). Is There a Carbapenem MIC Cutoff Value That Distinguishes Carbapenemase-Producing and Non-Carbapenemase-Producing Carbapenem Non-Susceptible *Pseudomonas* and *Acinetobacter* Isolates? *infection control & hospital epidemiology*, **38**(11): p. 1378-1379.

183. Martínez, P. and S. Mattar (2012). Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAbal-bla OXA-23, 51 and ISAbal-bla ADC-7 genes in Monteria, Colombia. *Brazilian journal of microbiology*, **43**(4): p. 1274-1280.
184. Rodríguez-Martínez, J.-M., et al. (2010). Extended-spectrum cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **54**(8): p. 3484-3488.
185. Heritier, C., L. Poirel, and P. Nordmann (2006). Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. *Clinical microbiology and infection*, **12**(2): p. 123-130.
186. Doyle, D., et al. (2012). Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *Journal of clinical microbiology*, **50**(12): p. 3877-3880.
187. Girlich, D., L. Poirel, and P. Nordmann (2012). Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology*, **50**(2): p. 477-479.
188. González, L.J., et al. (2016). Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo-[beta]-lactamase. *Nature chemical biology*, **12**(7): p. 516-522.

PHỤ LỤC 2

Kết quả đại diện so sánh giải trình tự sản phẩm PCR đoạn gen *bla*_{OXA-51-like} với trình tự gen chuẩn

Acinetobacter baumannii strain 19-63P73 OXA-51 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-882 (*bla*OXA) gene, *bla*OXA-882 allele, complete cds

Sequence ID: [MN476922.1](#) Length: 922 Number of Matches: 1

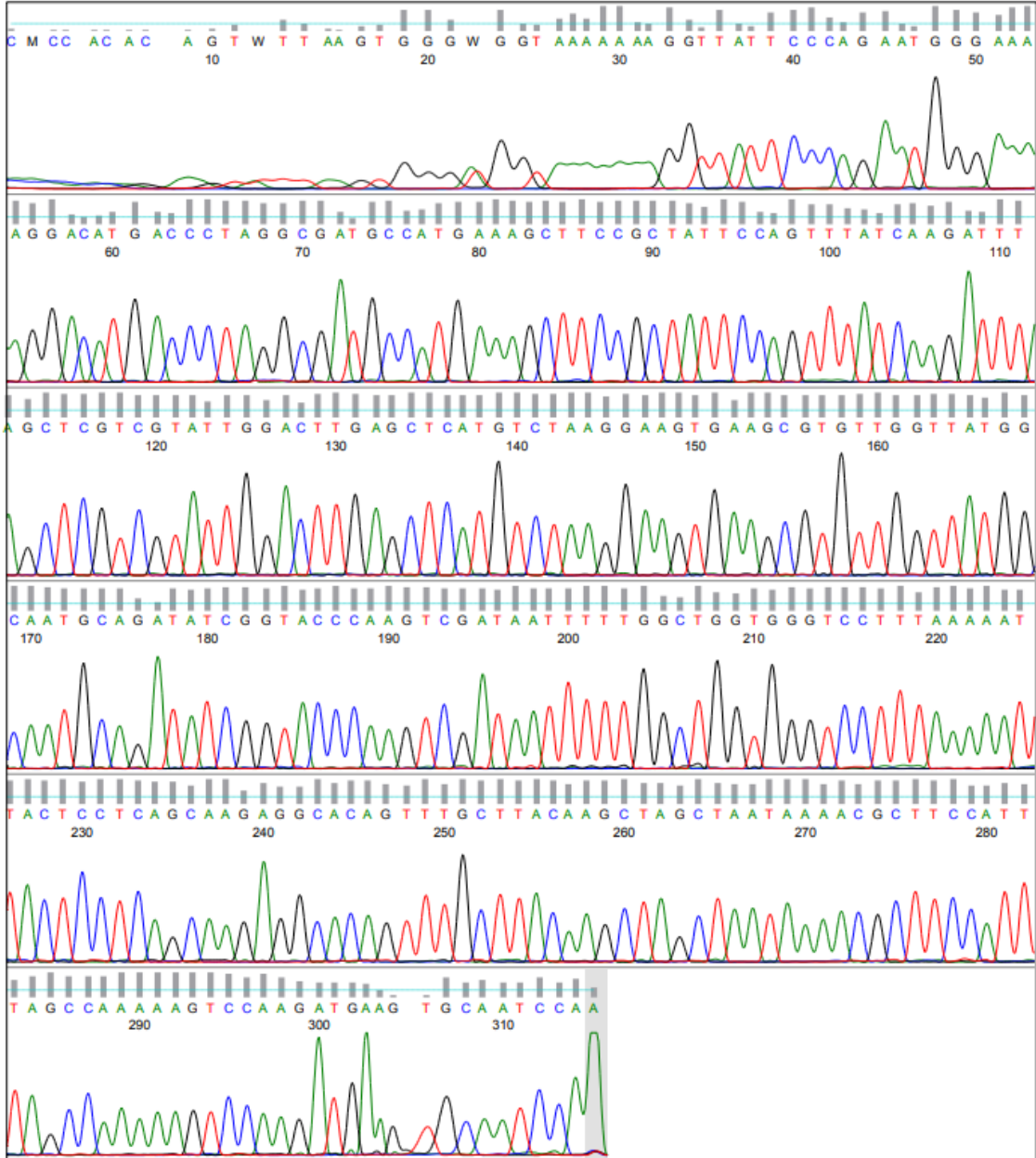
Range 1: 284 to 636 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match ▲](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
652 bits(353)	0.0	353/353(100%)	0/353(0%)	Plus/Plus
Query 1	TAATGCTTTGATCGGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAGTGGGA			60
Sbjct 284	TAATGCTTTGATCGGCCTTGAGCACCATAAGGCAACCACCACAGAAGTATTTAAGTGGGA			343
Query 61	TGGTaaaaaaaaGGTTATTCAGCAATGGGAAAAGGACATGACCCTAGGCGATGCCATGAA			120
Sbjct 344	TGGTAAAAAAGGTTATTCAGCAATGGGAAAAGGACATGACCCTAGGCGATGCCATGAA			403
Query 121	AGCTTCCGCTATTCCAGTTTATCAAGATTTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGTC			180
Sbjct 404	AGCTTCCGCTATTCCAGTTTATCAAGATTTAGCTCGTCGTATTGGACTTGAGCTCATGTC			463
Query 181	TAAGGAAGTGAAGCGTGTGGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAAGTCGATAATTT			240
Sbjct 464	TAAGGAAGTGAAGCGTGTGGTTATGGCAATGCAGATATCGGTACCCAAGTCGATAATTT			523
Query 241	TTGGCTGGTGGGTCCTTTAAAAATTACTCCTCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAGCT			300
Sbjct 524	TTGGCTGGTGGGTCCTTTAAAAATTACTCCTCAGCAAGAGGCACAGTTTGCTTACAAGCT			583
Query 301	AGCTAATAAAACGCTTCCATTTAGCCAAAAAGTCCAAGATGAAGTGCAATCCA			353
Sbjct 584	AGCTAATAAAACGCTTCCATTTAGCCAAAAAGTCCAAGATGAAGTGCAATCCA			636

Sample Name: OXA-51-2-OXA-51F
Mobility: KB_3500_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 11.3788
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1934, C = 1624, G = 1727, T = 2291
Lane/Cap#: 22
Matrix: n/a
Direction: Native



Kết quả hình ảnh giải trình tự sản phẩm PCR gen *bla*_{OXA-51-like}

PHỤ LỤC 3

Kết quả đại diện so sánh giải trình tự sản phẩm PCR đoạn gen *bla*_{OXA-23-like} với trình tự gen chuẩn

Acinetobacter baumannii Tn2008, blaOXA-23 gene for OXA-23, strain AB285

Sequence ID: [LS999838.1](#) Length: 5551 Number of Matches: 1

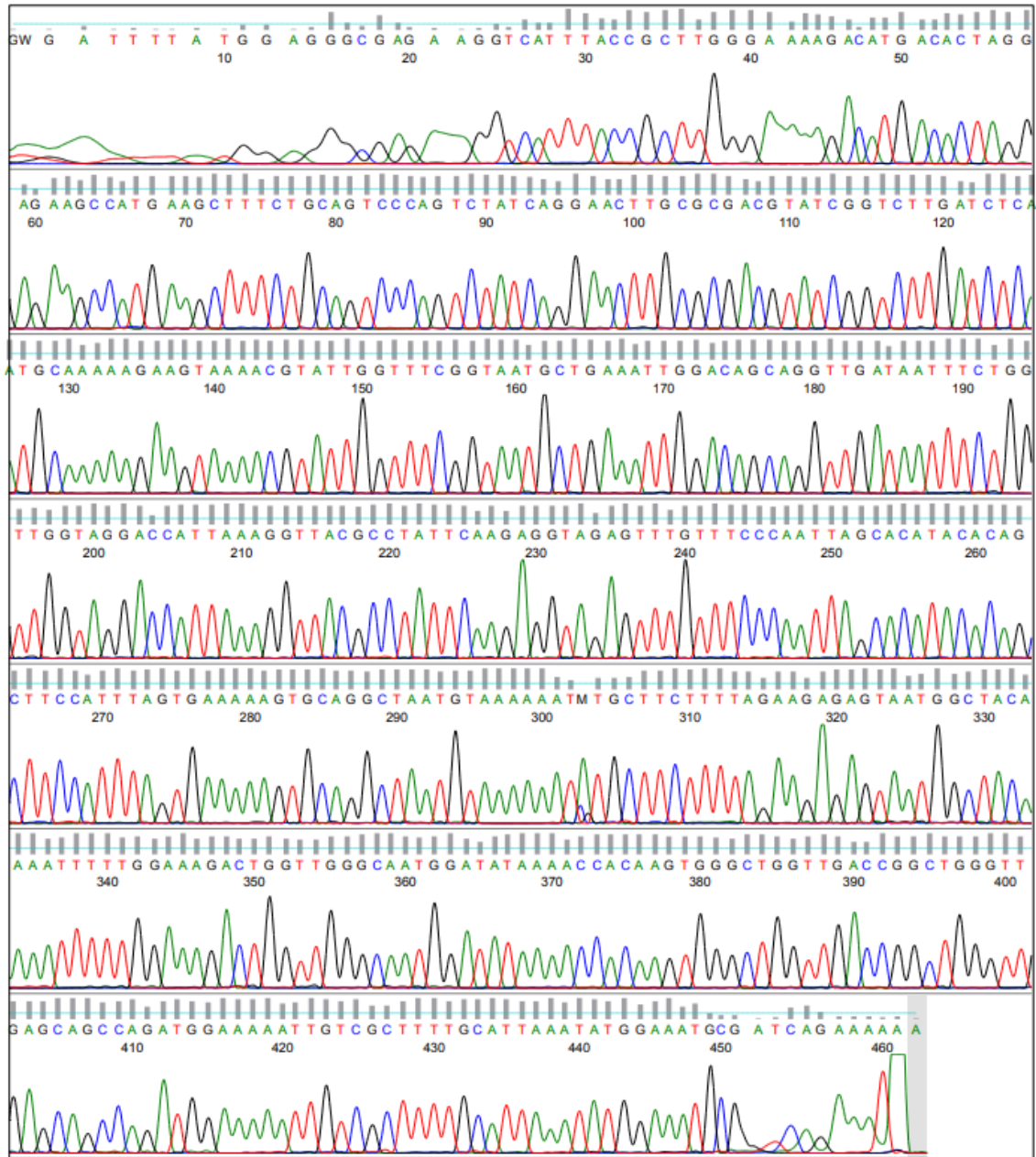
Range 1: 1743 to 2243 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ P

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
898 bits(486)	0.0	496/501(99%)	1/501(0%)	Plus/Plus
Query 1	TGATCGGATTTTAGAACCCAGAAAACGGATATTAATGAAATATTTAAATGGAAGGGCGAGA	60		
Sbjct 1743	TGATCGGATTGGAGAACCAGAAAACGGATATTAATGAAATATTTAAATGGAAGGGCGAGA	1802		
Query 61	AAAGGTCATTTACCGCTTGGG-AAAAGACATGACACTAGGAGAAGCCATGAAGCTTTCTG	119		
Sbjct 1803	AAAGGTCATTTACCGCTTGGGAAAAAGACATGACACTAGGAGAAGCCATGAAGCTTTCTG	1862		
Query 120	CAGTCCCAGTCTATCAGGAACTTGCGCGACGTATCGGTCTTGATCTCATGCAAAAAGAAG	179		
Sbjct 1863	CAGTCCCAGTCTATCAGGAACTTGCGCGACGTATCGGTCTTGATCTCATGCAAAAAGAAG	1922		
Query 180	TAAAACGTATTGGTTTCGGTAATGCTGAAATTGGACAGCAGGTTGATAATTTCTGGTTGG	239		
Sbjct 1923	TAAAACGTATTGGTTTCGGTAATGCTGAAATTGGACAGCAGGTTGATAATTTCTGGTTGG	1982		
Query 240	TAGGACCATTAAAGGTTACGCCTATTCAAGAGGTAGAGTTTGTTCCTCAATTAGCACATA	299		
Sbjct 1983	TAGGACCATTAAAGGTTACGCCTATTCAAGAGGTAGAGTTTGTTCCTCAATTAGCACATA	2042		
Query 300	CACAGCTTCCATTTAGTGAAAAAGTGCAGGCTAATGTAAAAAATMTGCTTCTTTTAGAAG	359		
Sbjct 2043	CACAGCTTCCATTTAGTGAAAAAGTGCAGGCTAATGTAAAAAATATGCTTCTTTTAGAAG	2102		
Query 360	AGAGTAATGGCTACAAAATTTTTGGAAAGACTGGTTGGGCAATGGATATAAAACCACAAG	419		
Sbjct 2103	AGAGTAATGGCTACAAAATTTTTGGAAAGACTGGTTGGGCAATGGATATAAAACCACAAG	2162		
Query 420	TGGGCTGGTTGACCGGCTGGGTTGAGCAGCCAGATGGAAAAATTGTCGCTTTTGCATTAA	479		
Sbjct 2163	TGGGCTGGTTGACCGGCTGGGTTGAGCAGCCAGATGGAAAAATTGTCGCTTTTGCATTAA	2222		
Query 480	ATATGGAAATGCGATCAGAAA	500		
Sbjct 2223	ATATGGAAATGCGGTCAGAAA	2243		

Sample Name: OXA-23-2-OXA-23F
Mobility: KB_3500_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 11.3945
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1077, C = 887, G = 1254, T = 1134
Lane/Cap#: 19
Matrix: n/a
Direction: Native



Kết quả hình ảnh giải trình tự sản phẩm PCR gen *bla*_{OXA-23-like}

PHỤ LỤC 3

Kết quả đại diện so sánh giải trình tự sản phẩm PCR đoạn gen *bla*_{OXA-58-like} với trình tự gen chuẩn

**Acinetobacter baumannii strain WCHAB005078 plasmid pOXA58_005078,
complete sequence**

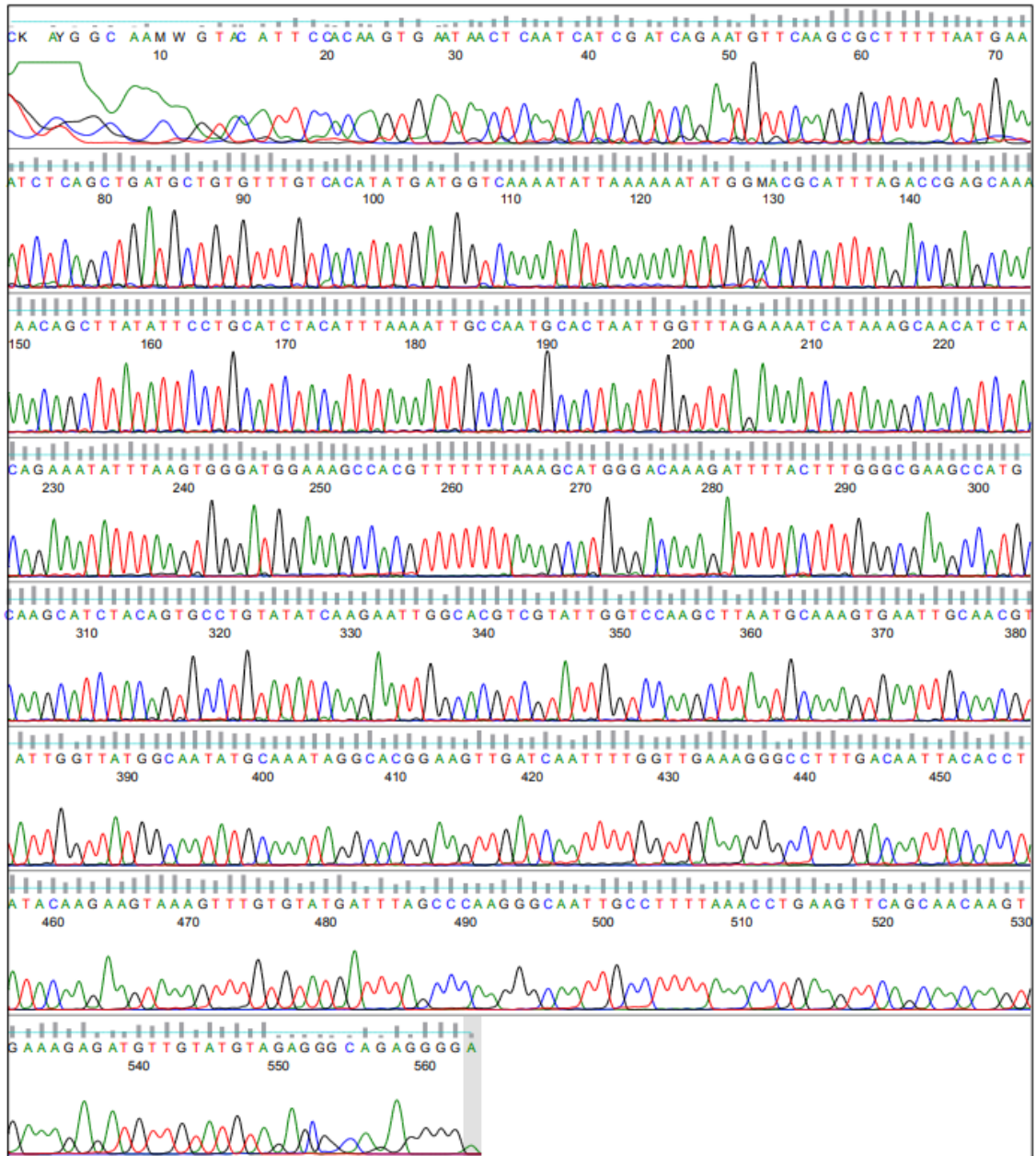
Sequence ID: [CP027245.2](#) Length: 70509 Number of Matches: 1

Range 1: 34403 to 35001 [GenBankGraphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1092 bits(591)	0.0	597/600(99%)	1/600(0%)	Plus/Minus
Query 2	AGTATTGGGGGCTTGTGCTGAGCATAGTATGAGTCGAGCAAAAACAAGTACAATTCCACA			61
Sbjct 35001	AGTATT -GGGGCTTGTGCTGAGCATAGTATGAGTCGAGCAAAAACAAGTACAATTCCACA			34943
Query 62	AGTGAATAACTCAATCATCGATCAGAATGTTCAAGCGCTTTTTAATGAAATCTCAGCTGA			121
Sbjct 34942	AGTGAATAACTCAATCATCGATCAGAATGTTCAAGCGCTTTTTAATGAAATCTCAGCTGA			34883
Query 122	TGCTGTGTTTGTACACATATGATGGTCAAAATATTAATAAATATGGMACGCATTTAGACCG			181
Sbjct 34882	TGCTGTGTTTGTACACATATGATGGTCAAAATATTAATAAATATGGCACGCATTTAGACCG			34823
Query 182	AGCAAAAACAGCTTATATTCCTGCATCTACATTTAAAATTGCCAATGCACTAATTGGTTT			241
Sbjct 34822	AGCAAAAACAGCTTATATTCCTGCATCTACATTTAAAATTGCCAATGCACTAATTGGTTT			34763
Query 242	AGAAAATCATAAAGCAACATCTACAGAAATATTTAAGTGGGATGGAAAGCCACGTTTTT			301
Sbjct 34762	AGAAAATCATAAAGCAACATCTACAGAAATATTTAAGTGGGATGGAAAGCCACGTTTTT			34703
Query 302	†AAAAGCATGGGACAAAGATTTTACTTTGGGCGAAGCCATGCAAGCATCTACAGTGCCTGT			361
Sbjct 34702	TAAAGCATGGGACAAAGATTTTACTTTGGGCGAAGCCATGCAAGCATCTACAGTGCCTGT			34643
Query 362	ATATCAAGAATTGGCACGTCGTATTGGTCCAAGCTTAATGCAAAGTGAATTGCAACGTAT			421
Sbjct 34642	ATATCAAGAATTGGCACGTCGTATTGGTCCAAGCTTAATGCAAAGTGAATTGCAACGTAT			34583
Query 422	TGGTTATGGCAATATGCAAATAGGCACGGAAGTTGATCAATTTTGGTTGAAAGGGCCTTT			481
Sbjct 34582	TGGTTATGGCAATATGCAAATAGGCACGGAAGTTGATCAATTTTGGTTGAAAGGGCCTTT			34523
Query 482	GACAATTACACCTATACAAGAAGTAAAGTTTGTGTATGATTTAGCCCAAGGGCAATTGCC			541
Sbjct 34522	GACAATTACACCTATACAAGAAGTAAAGTTTGTGTATGATTTAGCCCAAGGGCAATTGCC			34463
Query 542	TTTTAAACCTGAAGTTCAGCAACAAGTGAAAGAGATGTTGTATGTAGAGGGCAGAGGGGA			601
Sbjct 34462	TTTTAAACCTGAAGTTCAGCAACAAGTGAAAGAGATGTTGTATGTAGAGCGCAGAGGGGA			34403

Sample Name: OXA-58-2-OXA-58F
Mobility: KB_3500_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 11.4194
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 553, C = 426, G = 552, T = 564
Lane/Cap#: 2
Matrix: n/a
Direction: Native



Kết quả hình ảnh giải trình tự sản phẩm PCR gen *bla*_{OXA-58-like}

PHỤ LỤC 4

Kết quả đại diện so sánh giải trình tự sản phẩm PCR đoạn gen *bla*_{NDM-1} với trình tự gen chuẩn

Acinetobacter baumannii strain ASKPNAB9 subclass B1 metallo-beta-lactamase NDM-1 (*bla*_{NDM}) gene, *bla*_{NDM-1} allele, complete cds

Sequence ID: [MK682768.1](#) Length: 813 Number of Matches: 1

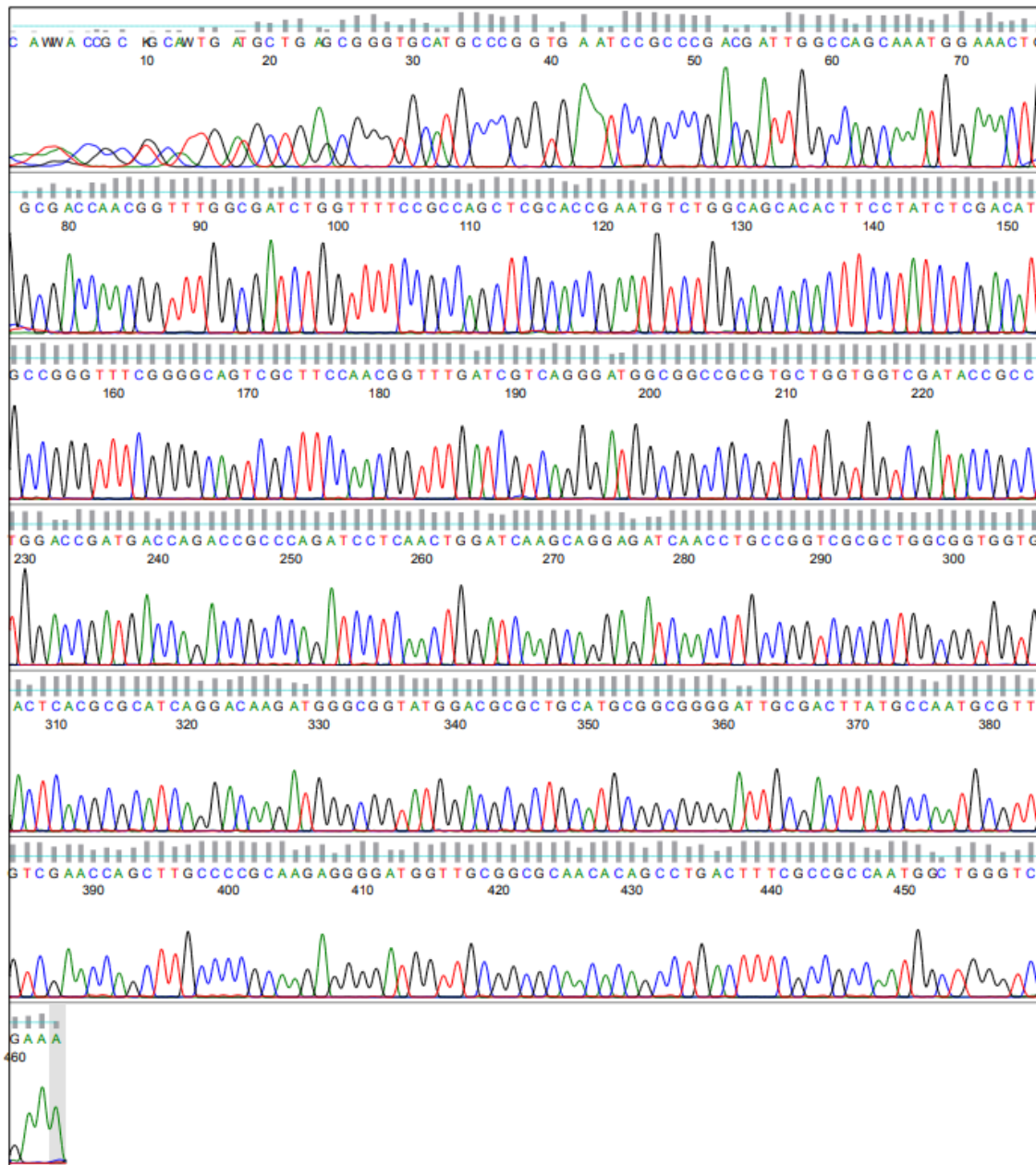
Range 1: 19 to 510 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ E

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
902 bits(488)	0.0	491/492(99%)	1/492(0%)	Plus/Plus
Query 5	ATGCACCCGGTCGCGAAGCTGAGCACCGCATTAGCCGCTGCATTGATGCTGAGCGGGTGC			64
Sbjct 19	ATGCACCCGGTCGCGAAGCTGAGCACCGCATTAGCCGCTGCATTGATGCTGAGCGGGTGC			78
Query 65	ATGCCCGGTG-AATCCGCCGACGATTGGCCAGCAAATGGAAACTGGCGACCAACGGTTT			123
Sbjct 79	ATGCCCGGTGAAATCCGCCGACGATTGGCCAGCAAATGGAAACTGGCGACCAACGGTTT			138
Query 124	GGCGATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACCGAATGTCTGGCAGCACACTTCCTATCTCGAC			183
Sbjct 139	GGCGATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACCGAATGTCTGGCAGCACACTTCCTATCTCGAC			198
Query 184	ATGCCGGGTTTCGGGGCAGTCGCTTCCAACGGTTTGATCGTCAGGGATGGCGGCCGCGTG			243
Sbjct 199	ATGCCGGGTTTCGGGGCAGTCGCTTCCAACGGTTTGATCGTCAGGGATGGCGGCCGCGTG			258
Query 244	CTGGTGGTCGATACCGCCTGGACCGATGACCAGACCGCCAGATCCTCAACTGGATCAAG			303
Sbjct 259	CTGGTGGTCGATACCGCCTGGACCGATGACCAGACCGCCAGATCCTCAACTGGATCAAG			318
Query 304	CAGGAGATCAACCTGCCGGTCGCGCTGGCGGTGGTGACTCACGCGCATCAGGACAAGATG			363
Sbjct 319	CAGGAGATCAACCTGCCGGTCGCGCTGGCGGTGGTGACTCACGCGCATCAGGACAAGATG			378
Query 364	GGCGGTATGGACGCGCTGCATGCGGCGGGGATTGCGACTTATGCCAATGCGTTGTGCAAC			423
Sbjct 379	GGCGGTATGGACGCGCTGCATGCGGCGGGGATTGCGACTTATGCCAATGCGTTGTGCAAC			438
Query 424	CAGCTTGCCCCGCAAGAGGGGATGGTTGCGGCGCAACACAGCCTGACTTTCGCCGCCAAT			483
Sbjct 439	CAGCTTGCCCCGCAAGAGGGGATGGTTGCGGCGCAACACAGCCTGACTTTCGCCGCCAAT			498
Query 484	GGCTGGGTCGAA	495		
Sbjct 499	GGCTGGGTCGAA	510		

Sample Name: NDM-1-49-NDM-1F
Mobility: KB_3500_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 11.3791
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 276, C = 435, G = 502, T = 294
Lane/Cap#: 5
Matrix: n/a
Direction: Native



Kết quả hình ảnh giải trình tự sản phẩm PCR gen *bla*_{NDM-1}

PHỤ LỤC 6

Kết quả đại diện so sánh giải trình tự sản phẩm PCR đoạn gen *ISAbal* với trình tự gen chuẩn

Acinetobacter baumannii strain B response regulator (adeR) gene, complete cds; insertion sequence ISAbal, complete sequence; and kinase sensor (adeS) gene, complete cds

Sequence ID: [JQ690824.1](#) Length: 3038 Number of Matches: 1

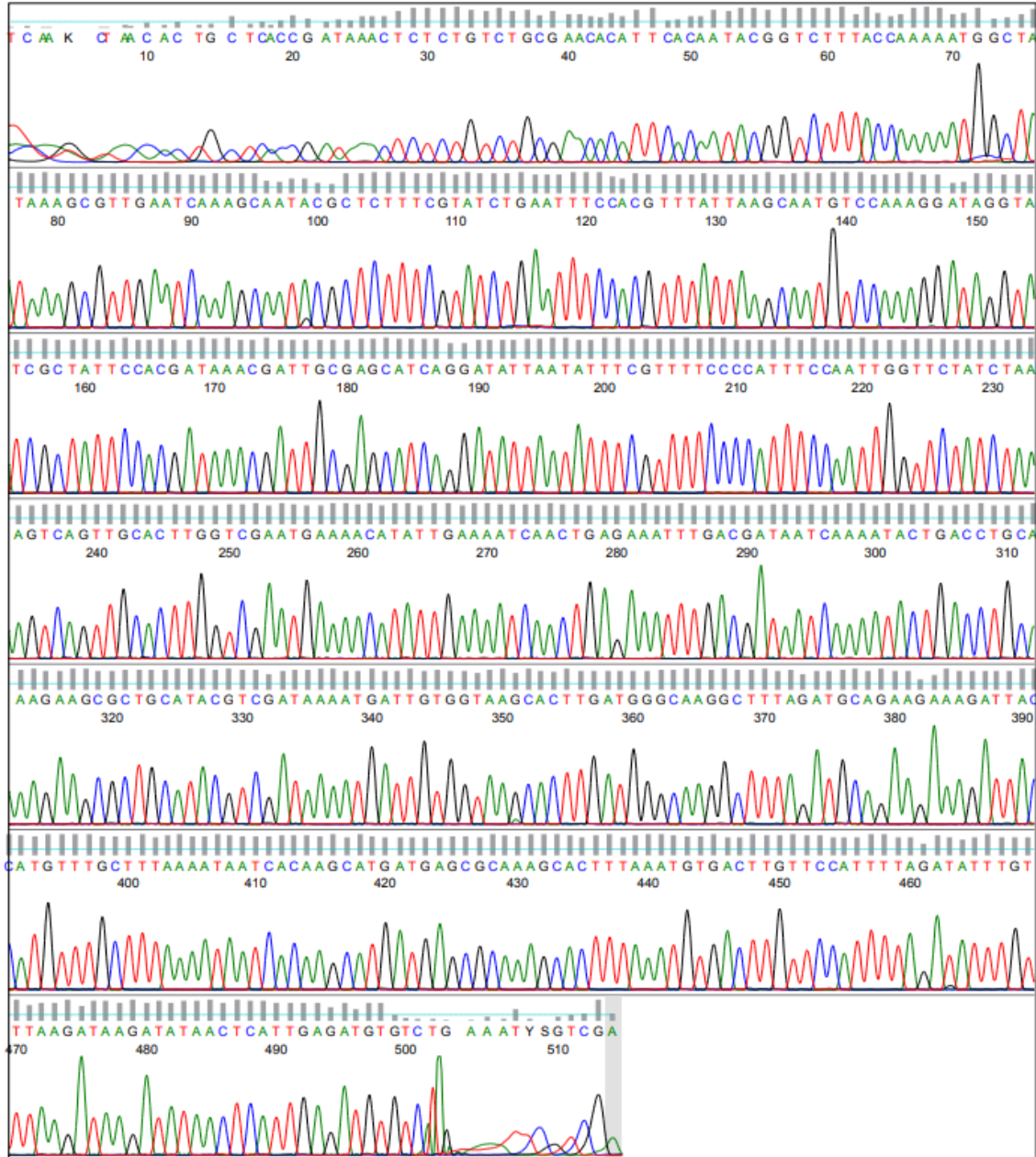
Range 1: 1733 to 2261 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
970 bits(525)	0.0	528/529(99%)	1/529(0%)	Plus/Plus
Query 12	GCA-AAGTTGATGTCTTGTTCAATTAACCATGTAAACCACTGCTCACCGATAAACTCTCT			70
Sbjct 1733	GCAGAAGTTGATGTCTTGTTCAATTAACCATGTAAACCACTGCTCACCGATAAACTCTCT			1792
Query 71	GTCTGCGAACACATTACAATACGGTCTTTACCAAAAATGGCTATAAAGCGTTGAATCAA			130
Sbjct 1793	GTCTGCGAACACATTACAATACGGTCTTTACCAAAAATGGCTATAAAGCGTTGAATCAA			1852
Query 131	AGCAATACGCTCTTTTCGTATCTGAATTTCCACGTTTATTAAGCAATGTCCAAAGGATAGG			190
Sbjct 1853	AGCAATACGCTCTTTTCGTATCTGAATTTCCACGTTTATTAAGCAATGTCCAAAGGATAGG			1912
Query 191	TATCGCTATTCCACGATAAACGATTGCGAGCATCAGGATATTAATATTTTCGTTTTCCCCA			250
Sbjct 1913	TATCGCTATTCCACGATAAACGATTGCGAGCATCAGGATATTAATATTTTCGTTTTCCCCA			1972
Query 251	TTTCCAATTGGTTCTATCTAAAGTCAGTTGCACTTGGTGAATGAAAACATATTGAAAAT			310
Sbjct 1973	TTTCCAATTGGTTCTATCTAAAGTCAGTTGCACTTGGTGAATGAAAACATATTGAAAAT			2032
Query 311	CAACTGAGAAATTTGACGATAATCAAATACTGACCTGCAAAGAAGCGCTGCATACGTCG			370
Sbjct 2033	CAACTGAGAAATTTGACGATAATCAAATACTGACCTGCAAAGAAGCGCTGCATACGTCG			2092
Query 371	ATAAAATGATTGTGGTAAGCACTTGATGGGCAAGGCTTTAGATGCAGAAGAAAGATTACA			430
Sbjct 2093	ATAAAATGATTGTGGTAAGCACTTGATGGGCAAGGCTTTAGATGCAGAAGAAAGATTACA			2152
Query 431	TGTTTGCTTTAAAATAATCACAAAGCATGATGAGCGCAAAGCACTTTAAATGTGACTTGTT			490
Sbjct 2153	TGTTTGCTTTAAAATAATCACAAAGCATGATGAGCGCAAAGCACTTTAAATGTGACTTGTT			2212
Query 491	CCATTTTAGATATTTGTTTAAAGATAAGATATAACTCATTGAGATGTGTC			539
Sbjct 2213	CCATTTTAGATATTTGTTTAAAGATAAGATATAACTCATTGAGATGTGTC			2261

Sample Name: 1-F1
Mobility: KB_3500_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 10.9709
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 3783, C = 3111, G = 3599, T = 4513
Lane/Cap#: 2
Matrix: n/a
Direction: Native



Kết quả hình ảnh giải trình tự sản phẩm PCR gen ISAb₁

PHỤ LỤC 7

Kết quả đại diện so sánh giải trình tự sản phẩm PCR đoạn gen *ISAbal/bla*_{OXA-23-like} với trình tự gen chuẩn

**Acinetobacter baumannii strain 6AB15 insertion sequence ISAbal, complete
sequence; and OXA-23 carbapenemase (oxa-23) gene, complete cds**
Sequence ID: [GQ849192.1](#) Length: 2036 Number of Matches: 1

Range 1: 781 to 1872 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1958 bits(1060)	0.0	1085/1096(99%)	6/1096(0%)	Plus/Plus
Query 15	ATTGCGAGCATCAGGATATTAATATTTTCGTTTTCCCATTTCCAATTGGTTCTATCTAAA			74
Sbjct 781	ATTGCGAGCATCAGGATATTAATATTTTCGTTTTCCCATTTCCAATTGGTTCTATCTAAA			840
Query 75	GTCAGTTGCACTTGGTCGAATGAAAACATATTGAAAATCAACTGAGAAA-TTGACGATAA			133
Sbjct 841	GTCAGTTGCACTTGGTCGAATGAAAACATATTGAAAATCAACTGAGAAAATTTGACGATAA			900
Query 134	TCAAAATACTGACCTGCAAAGAAGCGCTGCATACGTCGATAAAAATGATTGTGGTAAGCAC			193
Sbjct 901	TCAAAATACTGACCTGCAAAGAAGCGCTGCATACGTCGATAAAAATGATTGTGGTAAGCAC			960
Query 194	TTGATGGGCAAGGCTTTAGATGCAGAAGAAAGATTACATGTTTGCTTTAAAATAATCACA			253
Sbjct 961	TTGATGGGCAAGGCTTTAGATGCAGAAGAAAGATTACATGTTTGCTTTAAAATAATCACA			1020
Query 254	AGCATGATGAGCGCAAAGCACTTTAAATGTGACTTGTTCCATTTTAGATATTTGTTAAG			313
Sbjct 1021	AGCATGATGAGCGCAAAGCACTTTAAATGTGACTTGTTCCATTTTAGAGATTTGTTAAG			1080
Query 314	ATAAGATATAACTCATTGAGATGTGTCATAGTATTCGTCGTTAGAAAACAATTATTATGA			373
Sbjct 1081	ATAAGATATAACTCATTGAGATGTGTCATAGTATTCGTCGTTAGAAAACAATTATTATGA			1140
Query 374	CATTATTTCAATGAGTTATCTATTTTTGTCGTGTACAGAGCTCTTTTTTATTTTCTATTG			433
Sbjct 1141	CATTATTTCAATGAGTTATCTATTTTTGTCGTGTACAGAGCTCTTTTTTATTTTCTATTG			1200
Query 434	ATCTGGTGTAAAATGAATAAATATTTTACTTGCTATGTGGTTGCTTCTCTTTTTCTTT			493
Sbjct 1201	ATCTGGTGTAAAATGAATAAATATTTTACTTGCTATGTGGTTGCTTCTCTTTTTCTTT			1260
Query 494	CTGGTTGTACGGTTCAGCATAATTAATAAATGAAACCCCGAGTCAGATTGTTCAAGGAC			553
Sbjct 1261	CTGGTTGTACGGTTCAGCATAATTAATAAATGAAACCCCGAGTCAGATTGTTCAAGGAC			1320

Query	554	ATAATCAGGTGATTCATCAATACTTTGATGaaaaaaaaCACCTCAGGTGTGCTGGTTATTC	613
Sbjct	1321	ATAATCAGGTGATTCATCAATACTTTGATGAAAAAAAAACACCTCAGGTGTGCTGGTTATTC	1380
Query	614	AAACAGATaaaaaaaaTTAATCTATATGGTAATGCTCTAAGCCGCGCAAATACAGAATATG	673
Sbjct	1381	AAACAGATAAAAAAATTAATCTATATGGTAATGCTCTAAGCCGCGCAAATACAGAATATG	1440
Query	674	TGCCAGCCTCTACATTTAAAATGTTGAATGCCCTGATCGGATTGGAGAACCAGAAAACGG	733
Sbjct	1441	TGCCAGCCTCTACATTTAAAATGTTGAATGCCCTGATCGGATTGGAGAACCAGAAAACGG	1500
Query	734	ATATTAATGAAATATTTAAAATGGAAGGGCGAGAAAAGGTCATTTACCGCTTGGGAAAAAG	793
Sbjct	1501	ATATTAATGAAATATTTAAAATGGAAGGGCGAGAAAAGGTCATTTACCGCTTGGGAAAAAG	1560
Query	794	ACATGACACTAGGAGAAGCCATGAAGCTTTCTGCAGTCCCAGTCTATCAGGAACTTGCGC	853
Sbjct	1561	ACATGACACTAGGAGAAGCCATGAAGCTTTCTGCAGTCCCAGTCTATCAGGAACTTGCGC	1620
Query	854	GACGTATCGGTCTTGATCTCATGCAAAAAGAAGTAAAACGTATTTGGTTTCGGTAATGCT	913
Sbjct	1621	GACGTATCGGTCTTGATCTCATGCAAAAAGAAGTAAAACGTATA-TTGGTTTCGGTAATGCT	1679
Query	914	GAAATTGGACAGGCA-GTTGATAATTTCTGGGTTGGTAGGACCATTAAAGGTTACGCCTA	972
Sbjct	1680	GAAATTGGACAG-CAGGTTGATAATTTCT-GGTTGGTAGGACCATTAAAGGTTACGCCTA	1737
Query	973	TTCAAGAGGTAGAGTTTGTTCCTCAATTAGCACATACACAGCTTTCATTTAGTGAAAAA	1032
Sbjct	1738	TTCAAGAGGTAGAGTTTGTTCCTCAATTAGCACATACACAGC-TTCCATTTAGTGAAAAA	1796
Query	1033	GTGCAGGCTAATGaaaaaaaaTTTGCTTCTTTTAGAAGAGAGTAATGGCTACAAAATTTT	1092
Sbjct	1797	GTGCAGGCTAATGTAAAAAATATGCTTCTTTTAGAAGAGAGTAATGGCTACAAAATTTT	1856
Query	1093	GGAAAAGCTGGTTGGG 1108	
Sbjct	1857	GGAAAAGACTGGTTGGG 1872	

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GQ849192.1>

**Acinetobacter baumannii strain 6AB15 insertion sequence ISAbal,
complete sequence; and OXA-23 carbapenemase (oxa-23) gene,
complete cds**

GenBank: GQ849192.1

[FASTA Graphics](#)

LOCUS GQ849192 2036 bp DNA linear BCT 20-
APR-2010

DEFINITION Acinetobacter baumannii strain 6AB15 insertion sequence
ISAbal,
complete sequence; and OXA-23 carbapenemase (oxa-23) gene,
complete
cds.

ACCESSION GQ849192

VERSION GQ849192.1

KEYWORDS .

SOURCE Acinetobacter baumannii

ORGANISM [Acinetobacter baumannii](#)

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria;
Pseudomonadales; Moraxellaceae; Acinetobacter; Acinetobacter
calcoaceticus/baumannii complex.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2036)

AUTHORS Lin, Y.C., Hsia, K.C., Chen, Y.C., Sheng, W.H., Chang, S.C.,
Liao, M.H. and Li, S.Y.

TITLE Genetic basis of multidrug resistance in Acinetobacter spp.
clinical isolates in Taiwan

JOURNAL Antimicrob. Agents Chemother. (2010) In press

PUBMED [20194701](#)

REMARK Publication Status: Available-Online prior to print

REFERENCE 2 (bases 1 to 2036)

AUTHORS Lin, Y.-C., Hsia, K.-C., Chen, Y.-C., Sheng, W.-H., Chang, S.-C.
and Li, S.-Y.

TITLE Identification of antimicrobial-resistant genes associates
with fluoroquinolones, aminoglycosides, cephalosporins, and
carbapenemases in the Acinetobacter spp. clinical isolates
from Taiwan

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 3 (bases 1 to 2036)

AUTHORS Lin,Y.-C., Hisa,K.-C., Chen,Y.-C., Sheng,W.-H., Chang,S.-C.
and Li,S.-Y.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (25-AUG-2009) Research and Diagnostic Center,
Centers for Disease Control, No. 161, Kun-Yang Street, Taipei, Taiwan

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..2036
/organism="Acinetobacter baumannii"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="6AB15"
/isolation_source="patient in hospital"
/db_xref="taxon:470"

mobile element 1..1180
/mobile_element_type="insertion sequence:ISAbal"

gene 1215..2036
/gene="oxa-23"

CDS 1215..2036
/gene="oxa-23"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="OXA-23 carbapenemase"
/protein_id="ACW65151.1"

/translation="MNKYFTCYVVASLFLSGCTVQHNLINETPSQIVQGHNQVIHQYF

DEKNTSGVLVIQTDKKINLYGNALS RANTEYVPASTFKMLNALIGLENQKTDINEIFK

WKGEKRSFTAWEKDMTLGEAMKLSAVPVYQELARRIGLDLMQKEVKRIGFGNAEIGQQ

VDNFWLVGPLKVTPIQEVEFVSQLAHTQLPFSEKVQANVKNM L L L L EESNGYKIFGKTG

WAMDIKPQVGWLTGWVEQPDGKIVAFALNMEMRSEMPASIRNELLMKSLKQLNII"

ORIGIN

PHỤ LỤC 8
DANH SÁCH CHŨNG NGHIÊN CỨU

Số TT	Mã nghiên cứu	Mã bệnh phẩm	Phân lập từ loại bệnh phẩm	Ngày phân lập mẫu	Bệnh viện
1	1	1	Đờm	05.5.2016	Trung ương Huế
2	2	2	Dịch nội khí quản	05.5.2016	Trung ương Huế
3	3	3	Dịch nội khí quản	05.5.2016	Trung ương Huế
4	4	4	Dịch nội khí quản	05.5.2016	Trung ương Huế
5	5	5	Mủ	06.5.2016	Trung ương Huế
6	6	6	Mủ	14.5.2016	Trung ương Huế
7	7	7	Dịch nội khí quản	15.5.2016	Trung ương Huế
8	8	8	Máu	16.5.2016	Trung ương Huế
9	9	9	Đờm	16.5.2016	Trung ương Huế
10	10	10	Đờm	18.5.2016	Trung ương Huế
11	11	11	Đờm	31.5.2016	Trung ương Huế
12	12	12	Mủ	05.6.2016	Trung ương Huế
13	13	13	Dịch nội khí quản	14.6.2016	Trung ương Huế
14	14	14	Đờm	16.6.2016	Trung ương Huế
15	15	15	Dịch nội khí quản	25.6.2016	Trung ương Huế
16	16	16	Đờm	13.7.2016	Trung ương Huế
17	17	17	Đờm	17.7.2016	Trung ương Huế

18	18	18	Đòm	19.7.2016	Trung ương Huế
19	19	19	Dịch nội khí quản	22.7.2016	Trung ương Huế
20	20	20	Dịch nội khí quản	22.7.2016	Trung ương Huế
21	21	21	Mủ	25.7.2016	Trung ương Huế
22	22	22	Mủ	25.7.2016	Trung ương Huế
23	23	23	Mủ	27.7.2016	Trung ương Huế
24	24	39320	Đòm	13.5.2016	Đa khoa Nghệ An
25	25	20094	Đòm	18.5.2016	Đa khoa Nghệ An
26	26	39376	Đòm	21.5.2016	Đa khoa Nghệ An
27	27	39399	Đòm	24.5.2016	Đa khoa Nghệ An
28	28	39387	Đòm	25.5.2016	Đa khoa Nghệ An
29	29	39467	Đòm	03.6.2016	Đa khoa Nghệ An
30	30	39475	Đòm	03.6.2016	Đa khoa Nghệ An
31	31	39506	Đòm	03.6.2016	Đa khoa Nghệ An
32	32	39486	Mủ	04.6.2016	Đa khoa Nghệ An
33	33	39498	Đòm	04.6.2016	Đa khoa Nghệ An
34	34	1	Dịch phế quản	30.5.2016	Đa khoa Bắc Giang
35	36	2	Dịch phế quản	01.6.2016	Đa khoa Bắc Giang
36	37	3	Dịch phế quản	03.6.2016	Đa khoa Bắc Giang
37	38	4	Dịch phế quản	05.6.2016	Đa khoa Bắc Giang
38	39	9	Dịch phế quản	20.6.2016	Đa khoa Bắc Giang

39	40	10	Dịch phế quản	24.6.2016	Đa khoa Bắc Giang
40	41	11	Dịch phế quản	27.6.2016	Đa khoa Bắc Giang
41	42	12	Dịch phế quản	27.6.2016	Đa khoa Bắc Giang
42	43	13	Dịch phế quản	07.7.2016	Đa khoa Bắc Giang
43	44	14	Nước tiểu	08.7.2016	Đa khoa Bắc Giang
44	45	15	Mủ	08.7.2016	Đa khoa Bắc Giang
45	46	17	Máu	12.7.2016	Đa khoa Bắc Giang
46	47	18	Đờm	13.7.2016	Đa khoa Bắc Giang
47	49	137H	Dịch phế quản	15.02.2016	Thanh Nhàn
48	50	4T	Chân catheter	16.02.2016	Thanh Nhàn
49	51	893H	Dịch phế quản	25.4.2016	Thanh Nhàn
50	52	29T	Chân catheter	03.5.2016	Thanh Nhàn
51	53	968H	Dịch phế quản	06.5.2016	Thanh Nhàn
52	54	971H	Dịch phế quản	12.5.2016	Thanh Nhàn
53	55	2391M	Mủ	21.5.2016	Thanh Nhàn
54	56	1003H	Dịch phế quản	25.5.2016	Thanh Nhàn
55	58	1116H	Dịch phế quản	21.6.2016	Thanh Nhàn
56	60	1229H	Dịch phế	10.7.2016	Thanh Nhàn

			quản		
57	61	1258H	Dịch phế quản	15.7.2016	Thanh Nhàn
58	62	1270H	Dịch phế quản	18.7.2016	Thanh Nhàn
59	63	1002Đ	Đờm	26.6.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
60	64	1007Đ	Đờm	26.6.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
61	65	214D	Đờm	10.7.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
62	66	1045Đ	Đờm	12.7.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
63	67	1052Đ	Đờm	14.7.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
64	68	1063Đ	Đờm	17.7.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
65	69	225D	Dịch mủ	20.7.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
66	70	1078Đ	Đờm	22.7.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
67	71	1079Đ	Đờm	22.7.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
68	72	1082Đ	Đờm	25.7.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
69	73	1100Đ	Đờm	01.8.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
70	74	1107Đ	Đờm	04.8.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
71	77	238D	Dịch mủ	04.8.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
72	78	1119Đ	Đờm	06.8.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
73	79	1120Đ	Đờm	06.8.2016	Đa khoa Hà Tĩnh
74	84	3475m	Máu	21.7.2016	Thanh Nhàn
75	85	1284H	Dịch phế quản	21.7.2016	Thanh Nhàn
76	86	1317H	Dịch phế quản	15.8.2016	Thanh Nhàn
77	87	1419H	Dịch phế quản	08.9.2016	Thanh Nhàn

78	88	15221	Đòm	14.11.2016	Chợ Rẫy
79	89	15190	Đòm	14.11.2016	Chợ Rẫy
80	90	15144	Đòm	14.11.2016	Chợ Rẫy
81	91	15128	Đòm	14.11.2016	Chợ Rẫy
82	93	15073	Dịch phế quản	14.11.2016	Chợ Rẫy
83	94	15048	Đòm	14.11.2016	Chợ Rẫy
84	95	15016	Đòm	13.11.2016	Chợ Rẫy
85	96	14986	Đòm	14.11.2016	Chợ Rẫy
86	97	15203	Đòm	14.11.2016	Chợ Rẫy
87	98	15642	Dịch vết thương	15.11.2016	Chợ Rẫy
88	99	15487	Dịch vết thương	15.11.2016	Chợ Rẫy
89	100	15467	Đòm	15.11.2016	Chợ Rẫy
90	101	15338	Đòm	15.11.2016	Chợ Rẫy
91	102	15091	Dịch vết thương	14.11.2016	Chợ Rẫy
92	103	3DH	Dịch đường hô hấp	01.01.2016	Đa khoa Xanh Pôn
93	104	7M	Mủ	03.01.2016	Đa khoa Xanh Pôn
94	105	34DH	Dịch đường hô hấp	05.01.2016	Đa khoa Xanh Pôn
95	106	57DH	Dịch đường hô hấp	09.01.2016	Đa khoa Xanh Pôn
96	107	112DH	Dịch đường hô hấp	12.01.2016	Đa khoa Xanh Pôn
97	108	114DH	Dịch đường hô hấp	13.01.2016	Đa khoa Xanh Pôn

98	109	120DH	Dịch đường hô hấp	13.01.2016	Đa khoa Xanh Pôn
99	110	121DH	Dịch đường hô hấp	16.01.2016	Đa khoa Xanh Pôn
100	111	138DH	Dịch đường hô hấp	18.01.2016	Đa khoa Xanh Pôn
101	112	148DH	Dịch đường hô hấp	26.01.2016	Đa khoa Xanh Pôn
102	113	185DH	Dịch đường hô hấp	26.01.2016	Đa khoa Xanh Pôn
103	114	191DH	Dịch đường hô hấp	28.01.2016	Đa khoa Xanh Pôn
104	115	192DH	Dịch đường hô hấp	28.01.2016	Đa khoa Xanh Pôn
105	116	222DH	Dịch đường hô hấp	10.02.2016	Đa khoa Xanh Pôn
106	117	223DH	Dịch đường hô hấp	18.02.2017	Đa khoa Xanh Pôn
107	118	247DH	Dịch đường hô hấp	28.02.2018	Đa khoa Xanh Pôn
108	119	269DH	Dịch đường hô hấp	05.03.2019	Đa khoa Xanh Pôn
109	120	BQD-TH-01	Dịch phế quản	11.10.2016	TW Quân đội 108
110	121	BQD-MU-26	Mủ	03.10.2016	TW Quân đội 108
111	122	BQD-MU-32	Mủ	23.11.2016	TW Quân đội 108
112	123	BQD-TH-08	Dịch phế quản	16.11.2016	TW Quân đội 108
113	125	BQD-TH-28	Dịch phế quản	06.10.2016	TW Quân đội 108
114	126	BQD-TH-29	Dịch phế quản	07.11.2016	TW Quân đội 108

115	127	BQD-TH-31	Dịch phế quản	03.10.2016	TW Quân đội 108
116	128	BQD-TH-47	Dịch phế quản	13.11.2016	TW Quân đội 108
117	130	BQD-NT-15	Nước tiểu	08.12.2016	TW Quân đội 108
118	131	BQD-NT-09	Nước tiểu	13.03.2016	TW Quân đội 108
119	132	BQD-TH-34	Dịch phế quản	24.10.2016	TW Quân đội 108
120	133	BQD-TH-40	Dịch phế quản	10.10.2016	TW Quân đội 108
121	134	BQD-MA-9	Máu	28.10.2016	TW Quân đội 108
122	136	BQD-MA-34	Máu	08.04.2016	TW Quân đội 108
123	137	BQD-MA-37	Máu	24.02.2016	TW Quân đội 108
124	139	BNĐ-TH-74	Dịch phế quản	12.5.2016	Nhi Đồng 1
125	140	BNĐ-TH-158	Dịch phế quản	19.8.2016	Nhi Đồng 1
126	141	BNĐ-TH-143	Dịch phế quản	10.7.2016	Nhi Đồng 1
127	142	BNĐ-TH-55	Dịch phế quản	21.4.2016	Nhi Đồng 1
128	143	BNĐ-TH-4	Dịch phế quản	11.01.2016	Nhi Đồng 1
129	144	BNĐ-TH-24	Dịch phế quản	10.02.2016	Nhi Đồng 1
130	145	1473H	Dịch phế quản	15.9.2016	Thanh Nhàn
131	146	1478H	Dịch phế quản	15.9.2016	Thanh Nhàn

132	147	3562n	Nước tiểu	16.9.2016	Thanh Nhàn
133	148	1498H	Dịch phế quản	21.9.2016	Thanh Nhàn
134	149	3431M	Mủ vết mổ	25.9.2016	Thanh Nhàn
135	150	1699H	Dịch phế quản	05.10.2016	Thanh Nhàn
136	151	BNĐ-TH-25	Dịch phế quản	12.02.2016	Nhi Đồng 1
137	152	BNĐ-TH-64	Dịch phế quản	21.04.2016	Nhi Đồng 1
138	153	BNĐ-TH-147	Dịch phế quản	28.07.2016	Nhi Đồng 1
139	154	BNĐ-MAH-24	Máu	29.04.2016	Nhi Đồng 1
140	155	BNĐ-TH-141	Dịch phế quản	08.07.2016	Nhi Đồng 1
141	156	BNĐ-TH-69	Dịch phế quản	21.07.2016	Nhi Đồng 1
142	157	BNĐ-TH-67	Dịch phế quản	20.07.2016	Nhi Đồng 1
143	158	BNĐ-TH-23	Dịch phế quản	05.01.2016	Nhi Đồng 1
144	159	BNĐ-TH-72	Dịch phế quản	10.05.2016	Nhi Đồng 1