NHIỄM TRÙNG HÔ HẤP DO *ACINETOBACTER BAUMANNII* CỰC KHÁNG MANG ENZYME CARBAPENEMASE VÀ GIẢI PHÁP PHỐI HỢP KHÁNG SINH

Nguyễn Sĩ Tuấn[1], Ngô Thị Bích Huyền[1], Lưu Trần Linh Đa[1], Phạm Văn Dũng[1].

Mở đầu: Acinetobacter baumannii là vi khuẩn hàng đầu gây nhiễm khuẩn đường hô hấp và kháng carbapenem với tỷ lệ cao. Việc tìm ra giải pháp điều trị hiệu quả đối với *Acinetobacter baumannii* mang các nhóm gene mã hóa enzyme thủy phân carbapenem đang là vấn đề cấp thiết của các nhà lâm sàng hiện nay. *Mục tiêu:* Đánh giá tình hình đề kháng kháng sinh của *Acinetobacter baumannii* với meropenem, colistin, tỷ lệ các nhóm genemã hóa enzyme thủy phân carbapenem và tác dụng phối hợp của colistin với meropenem đối với vi khuẩn này. *Phương pháp:* Nghiên cứu mô tả, cắt ngang, phân tích. Các chủng *Acinetobacter baumannii* gây nhiễm khuẩn đường hô hấp dưới tại Bệnh viện đa khoa Thống Nhất tỉnh Đồng Nai được lấy mẫu trong thời gian từ tháng 3/2014 đến tháng 12/2015. *Kết quả:* Số chủng *Acinetobacter baumannii* được nghiên cứu là 110. Tỷ lệ đề kháng với meropenem và colistin lần lượt là 100% và 0%. Tỷ lệ mang gene kháng carbapenem với OXA - 51, OXA - 23, OXA - 58 và NDM - 1 lần lượt là 91,7%, 80%, 6,7% và 8,3%.Việc phối hợp kháng sinh meropenem/colistin cho tác dụng hiệp đồng và cộng lực là 67% và không có tác dụng đối kháng. Colistin ở các nồng độ dưới MIC có tác dụng chuyển các chủng *Acinetobacter baumannii*mang cả 4 nhóm gene tiết carbapenemase (NDM - 1, OXA - 23, OXA - 51 và OXA - 58) không nhạy meropenem thành nhạy. *Kết luận: Acinetobacter baumannii* đề kháng hoàn toàn với meropenem. Việc phối hợp meropenem với colistin cho tác dụng diệt khuẩn tương đối hiệu quả đối với *Acinetobacter baumannii*.

Từ khóa: meropenem, colistin, phối hợp, gene tiết carbapenemase, *Acinetobacter baumannii*.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm khuẩn Bệnh viện (NKBV) đang trở thành một trong những thách thức lớn đối với ngành Y tế của mọi quốc gia trên thế giới. Trong NKBV, nhiễm khuẩn hô hấp (NKHH) là bệnh lý nhiễm khuẩn đứng hàng thứ hai về mức độ phổ biến nhưng có tỷ lệ tử vong đứng hàng đầu, nhất là đối với những bệnh nhân được hỗ trợ thông khí cơ học. *Acinetobacter baumannii (Ab)* là một trong các tác nhân gây NKHH thường gặp nhất hiện nay. Trong những năm gần đây, *Ab* tăng rất nhanh khả năng đề kháng kháng sinh, đặt ra những thách thức vô cùng lớn cho các nhà lâm sàng cũng như vi sinh y học. Tìm ra giải pháp đối phó hợp lý với *Ab* là vấn đề đầu tiên phải nghĩ đến khi muốn cải thiện tình trạng NKHH nói riêng và NKBV nói chung, ít nhất là trong giai đoạn hiện nay. Trước đây, để điều trị nhiễm khuẩn do *Ab*, người ta thường dùng 2 loại kháng sinh thuộc nhóm carbapenem là imipenem và meropenem. Nhưng trong vài năm gần đây, *Ab* bắt đầu đề kháng carbapenem với tỷ lệ cao buộc chúng ta phải có giải pháp mới thay thế, một trong số đó là giải pháp phối hợp colistin với meropenem/imipenem và giải pháp này đã chứng tỏ được hiệu quả và khả thi ở nhiều nơi trên thế giới. Do đó, đề tài nghiên cứu "Nhiễm khuẩn hô hấp do *Acinetobacter baumannii* cực kháng mang enzyme car-

[1]Bệnh viện đa khoa Thống Nhất Đồng Nai.
Ngày nhận bài: *05/7/2016*
Ngày phản biện xong: *15/7/2016.*
Ngày duyệt đăng: *18/8/2016.*
Người chịu trách nhiệm nội dung khoa học: *Nguyễn Sĩ Tuấn, Bệnh viện đa khoa Thống Nhất Đồng Nai.*
Điện thoại 0913706564. E-mail nsituan@gmail.com

bapenemase và giải pháp phối hợp kháng sinh" được tiến hành nhằm các mục tiêu: 1. Đánh giá tình hình đề kháng kháng sinh của *Acinetobacter baumannii* đối với meropenem, colistin bằng phương pháp vi pha loãng kháng sinh trong giếng; 2. Xác định tỷ lệ các gene mã hóa enzyme thủy phân carbapenem ở *Ab*; 3. Khảo sát tác dụng phối hợp của phối hợp kháng sinh giữa meropenem/colistin đối với *Acinetobacter baumannii* gây NKHH.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu: Các chủng *Acinetobacter baumannii* phân lập được từ bệnh nhân nhập vào bệnh viện Đa khoa Thống Nhất tỉnh Đồng Nai từ 1/1/2014 đến 1/11/2015 và lấy mẫu nuôi cấy vi sinh ở thời điểm 48 giờ sau khi nhập viện và được chẩn đoán là nhiễm khuẩn hô hấp theo tiêu chuẩn chẩn đoán của ATS 2005, được chọn làm đối tượng nghiên cứu.

Phương pháp: Nghiên cứucắt dọc, mô tả.

Kỹ thuật thu thập số liệu

Ghi nhận kiểu hình kháng thuốc kháng sinh của *Acinetobacter baumannii* bằng phương pháp vi pha loãng kháng sinh trong giếng (phương pháp ô cờ)[4]. Ghi nhận kiểu gene mã hóa enzyme thủy phân carbapenem bằng phương pháp multiplex PCR và điện di sản phẩm PCR trên gel agarose[5]. Xác nhận lại các kiểu gene thu thập từ PCR bằng kỹ thuật giải trình tự Sanger. Ghi nhận các kiểu tác động của kháng sinh colistin kết hợp với meropenem bằng phương pháp Ô cờ[4]. Ghi nhận thông tin hành chánh của bệnh nhân: Tên, tuổi, thời điểm lấy mẫu cấy vi sinh, loại bệnh phẩm, chẩn đoán ban đầu.

Phương pháp Ô cờ

Đánh giá tác dụng phối hợp kháng sinh bằng phương pháp vi pha loãng trên khay 96 giếng và tính chỉ số FIC (FIC index) để kết luận phối hợp kháng sinh có tác dụng hiệp đồng, cộng lực, độc lập hay đối kháng. FIC = Fractional Inhibition Concentration[4].

FICMeropenem=MICMeropenem khi có hiện diện ColistinMIC chỉ có Meropenem

FICColistin=MICColistin khi có hiện diện MeropenemMIC chỉ có Colistin

FIC index = FICMeropenem+ FICColistin

+ Hiệp đồng (synergism): FIC index ≤ 0,5.

+ Cộng lực (additive): FIC index > 0.5 tới ≤ 1.

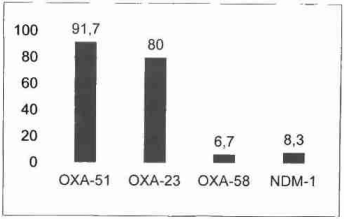
+ Độc lập (independent): FIC index > 1 tới < 4.

+ Đối kháng (antagonism): FIC index ≥ 4.

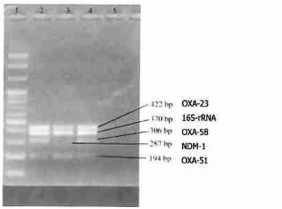
KẾT QUẢ

Tổng số chủng *Acinetobacter baumannii* thu thập được từ các mẫu đàm và dịch hút phế quản phù hợp với tiêu chuẩn chọn mẫu của nghiên cứu này là 110.

Phân bố của các nhóm gene mã hóa enzyme thủy phân carbapenem ở Acinetobacter baumannii đề kháng meropenem



Biểu đồ 1. Tỉ lệ Ab mang gen kháng carbapenem



Hình 1. Multiplex PCR phát hiện gene mã hóa các carbapenemase ở *Ab*.

Cơ chế *Acinetobacter baumannii* đề kháng meropenem, imipenem chủ yếu do mang các gene mã hóa enzyme carbapenemase, gồm carbapenemase nhóm D (OXA - 23, 51, 58) và carbapenemase nhóm B là New - Delhi Metallo – β – lactamase - 1 (NDM - 1) với tỷ lệ phân bố tới 8,3% (Biểu đồ 1 và Hình 1).

Các tác dụng phối hợp của colistin với meropenem trên Acinetobacter baumannii đề kháng meropenem

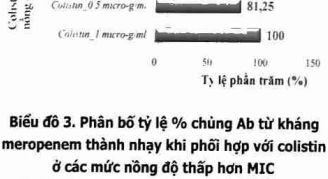
Các phối hợp meropenem/colistin đều cho tác dụng hiệp đồng và cộng lực khá cao, tác dụng độc lập thấp và

không có tác dụng đối kháng giữa 2 loại kháng sinh này, khi xét những chủng đã đề kháng với meropenem (Biểu đồ 2). Trích từ bảng số liệu nêu trên, các tác dụng phối hợp của colistin với meropenem được minh họa rõ hơn trong biểu đồ sau:

Biểu đồ 2. Tác dụng phối hợp meropenem/colistin ở *Acinetobacter baumannii*

Colistin khi phối hợp với meropenem đã thực sự trở thành một chọn lựa tốt và hiệu quả để điều trị các nhiễm trùng do *Acinetobacter baumannii* đa kháng thuốc gây nên.Các tổ hợp meropenem/colistin được đề cập ở trên đây đã cho thấy một tác dụng diệt khuẩn hiệp đồng và cộng lực đối với các chủng *Ab* mang gene mã hóa các nhóm enzyme thủy phân carbapenem cả nhóm D (OXA - 23, 51, 58) và nhóm B (NDM - 1).

Tác dụng của colistin ở nồng độ thấp hơn MIC phối hợp với meropenem để Acinetobacter baumannii từ kháng meropenem thành nhạy cảm với meropenem



Biểu đồ 3. Phân bố tỷ lệ % chủng Ab từ kháng meropenem thành nhạy khi phối hợp với colistin ở các mức nồng độ thấp hơn MIC

Colistin ở các nồng độ dưới MIC có khả năng hiệp đồng, cộng lực với meropenem để các chủng *Acinetobacter baumannii* đề kháng meropenem trở nên nhạy. Cụ thể, ở mức nồng độ 0,125µg/ml colistin, tỷ lệ chuyển chủng đã rõ rệt và tăng dần theo nồng độ colistin. Khi meropenem phối hợp với colistin ở mức nồng độ 1µg/ml, 100% các chủng *Acinetobacter baumannii* đề kháng với meropenem đều chuyển thành nhạy.

BÀN LUẬN

Phân bố của các nhóm gene mã hóa enzyme thủy phân carbapenem ở Acinetobacter baumannii đề kháng meropenem

OXA-51 là một gene nằm trên nhiễm sắc thể *Acinetobacter baumannii*, cần thiết để điều hòa vùng thượng nguồn bởi IS*Aba*1 để kích thích tính kháng carbapenem[2]. Tỷ lệ OXA - 51 trong các chủng *Acinetobacter baumannii* của nghiên cứu này là 91,7%. Kết quả này khá phù hợp với tỷ lệ trong nghiên cứu của Karmostaji và cộng sự năm 2013, trong đó 93,89% các chủng *Acinetobacter baumannii* mang gene OXA - 51[4].

Tỷ lệ OXA - 23 ở các chủng *Acinetobacter baumannii*trong nghiên cứu này là 80%. Kết quả này này cao hơn nhiều so với tỷ lệ OXA - 23 chung là 66,5% phát hiện ở các quốc gia châu Á - Thái Bình Dương (Ấn Độ, Trung Quốc, Thái Lan, Singapore, Hồng Kong và Hàn Quốc; không có Việt Nam)[5]. Trong một nghiên cứu khác được tiến hành bởi Feiz*aba*di và cộng sự (2008), cho thấy có 36,5% các chủng *Acinetobacter baumannii* phân lập từ lâm sàng có tỷ lệ mang gene OXA - 23[3]. Sự phân bố gene OXA khác biệt nhau ở trên thế giới có thể là do OXA - 23 là một gene đề kháng carbapenem mắc phải nằm trên plasmid (có khả năng di truyền di động) của *Acinetobacter baumannii*, vì thế có một tỷ lệ khác nhau được phát hiện so với gene OXA - 51 là gene kháng carbapenem xuất hiện tự nhiên nằm trên nhiễm sắc thể của *Acinetobacter baumannii* [4,5]. Tương tự, tỷ lệ OXA - 58 ở các chủng *Acinetobacter baumannii*trong nghiên cứu này là 6,7%. Số liệu này bằng gần một phần hai tỷ lệ 15% OXA - 58 ở *Acinetobacter baumannii* trong nghiên cứu của Feiz*aba*di và cộng sự tại Iran năm 2008[3].

Về mặt cơ chế *Acinetobacter baumannii* đề kháng carbapenem, các kết quả này cũng phù hợp với các tổng kết gần đây của Tada và cộng sự công bố năm 2013 tại 2 bệnh viện Bạch Mai và Chợ Rẫy, theo đó trong cơ chế tiết enzyme phá hủy kháng sinh carbapenem, các OXA-carbapenemase lớp D (Ambler carbapenemase lớp D) phổ biến trên toàn thế giới và khu vực châu Á - Thái Bình Dương lưu hành chủ yếu các chủng *Acinetobacter bau-*

mannii mang gene mã hóa nhóm OXA - 23[4].

Tác dụng hiệp đồng và cộng lực của colistin với meropenem đối với Acinetobacter baumannii

Meropenem/colistin cho tác dụng phối hợp tốt – hiệp đồng hoặc cộng lực – đối với *Acinetobacter baumannii* với tỷ lệ cao và hoàn toàn không có tác dụng đối kháng.

Một nghiên cứu của Ziad Daoud và cộng sự[1] với phương pháp tương tự cũng cho kết quả tương tự về tỷ lệ cộng lực và hiệp đồng của phối hợp meropenem/colistin.

Một nghiên cứu tương tự khác của Alex vam Belkum[5] mới được thực hiện cũng dùng kỹ thuật bàn cờ để đánh giá tác dụng phối hợp kháng sinh meropenem/colistin đối với 27 mẫu *Acinetobacter baumannii* đa kháng được thu thập từ một bệnh viện tại Thụy Sĩ, thì các phối hợp kháng sinh cũng không cho tác dụng đối kháng, trong khi tỷ lệ hiệp đồng gấp đôi tỷ lệ cộng lực. Sự khác biệt giữa kết quả của chúng tôi với nghiên cứu này có thể là do sự khác biệt về tình trạng sử dụng kháng sinh giữa hai nơi thực hiện nghiên cứu dẫn đến khác biệt về tính nhạy cảm của *Acinetobacter baumannii* đối với meropenem.

Tác dụng phối hợp giữa colistin với meropenem để Acinetobacter baumannii từ đề kháng với meropenem thành nhạy meropenem

Colistin có khả năng hiệp đồng, cộng lực với meropenemđể các chủng *Acinetobacter baumannii* từ đề kháng meropenem thành nhạy meropenem ở các mức nồng độ dưới MIC của colistin. Kết quả này tương đối phù hợp với một nghiên cứu tương tự của Nguyễn Hồng Tâm và cộng sự[6] đối với phối hợp meropenem/colistin. Colistin trong nghiên cứu này chỉ cần có mức nồng độ thấp hơn 1 bậc đã đạt được tỷ lệ chuyển đổi tương đương với nghiên cứu của Nguyễn Hồng Tâm. Sự không đồng nhất này có thể là do trong nghiên cứu của tác giả Hồng Tâm, tính đề kháng của *Acinetobacter baumannii* cao hơn (đề kháng với meropenem hơn 94% so với gần 76% của nghiên cứu chúng tôi).

Việc chứng minh colistin ở cả 4 mức nồng độ dưới MIC (< 2µg/ml) đều có khả năng giúp chuyển đổi các chủng *Acinetobacter baumannii* từ đề kháng với meropenem thành nhạy cũng rất có ý nghĩa về mặt thực tiễn vì đây là mức nồng độ mà colistin dễ dàng đạt được trong dịch cơ thể sau vài giờ điều trị với liều thông thường, có nghĩa là các phối hợp kháng sinh trên hứa hẹn mang lại hiệu quả điều trị cao và khả thi, đặc biệt là phối hợp meropenem/colistin ở nồng độ colistin từ 0,5µg/ml đến 1µg/ml.

KẾT LUẬN

Acinetobacter baumannii đề kháng carbapenem chủ yếu là do nhóm gene OXA - 51 và OXA - 23 (lần lượt là 91,7% và 80%). Tỷ lệ phân bố NDM - 1 ở *Acinetobacter baumannii* chiếm tới 8,3%, đây thực sự là một báo động với tình hình *Acinetobacter baumannii* kháng thuốc hiện nay.

Colistin khi phối với meropenem có khả năng tạo các tác dụng hiệp đồng và cộng lực với tỷ lệ cao (lần lượt là 31,7% và 29,5%) đối với *Acinetobacter baumannii*.

Colistin khi phối hợp với meropenem có khả năng chuyển các chủng đề kháng với meropenem thành nhạy ở cả 4 nồng độ colistin dưới MIC có ý nghĩa cao về mặt lâm sàng.

KHUYẾN NGHỊ

Thường xuyên theo dõi tình hình đề kháng, các gene mã hóa enzyme thủy phân carbapenem và đáp ứng điều trị của *Acinetobacter baumannii*, đặc biệt đối với colistin và carbapenem để có biện pháp đối phó kịp thời nhằm hạn chế làm gia tăng chủng đề kháng.

Có thể sử dụng colistin phối hợp với meropenem để điều trị *Acinetobacter baumannii* đề kháng với kháng sinh nhóm carbapenem.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Daoud, Z., Mansour, N. & Masri, K. (2013). Synergistic combination of carbapenems and colistin against *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. Open Journal of Medical Microbiology, 3 (4), 253-258.

2. Ehlers, M. M., Hughes, J. M., & Kock, M. M. (2012). Prevalence of Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. INTECH Open Access Publisher.

3. Feizabadi, M. M., Fathollahzadeh, B., Taherikalani, M., Rasoolinejad, M., Sadeghifard, N., Aligholi, M., ... & Mohammadi - Yegane, S. (2008). Antimicrobial susceptibility patterns and distribution of bla_{OXA} genes among *Acinetobacter* spp. Isolated from patients at Tehran hospitals. Jpn J Infect Dis, 61(4), 274-8.

4. Karmostaji, A., Peerayeh, S. N., & Salmanian, A. H. (2013). Distribution of OXA-Type Class D β - Lactamase Genes Among Nosocomial Multi - Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated in Tehran Hospitals. Jundishapur Journal of Microbiology, 6(5).

5. Mendes, R. E., Bell, J. M., Turnidge, J. D., Castanheira, M., & Jones, R. N. (2009). Emergence and widespread dissemination of OXA - 23,- 24/40 and - 58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia - Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. Journal of antimicrobial chemotherapy, 63(1), 55 - 59.

6. Merkier, A. K., & Centrón, D. (2006). bla_{OXA} – 51 - type β - lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. International journal of antimicrobial agents, 28(2), 110-113.

7. Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., & Bonomo, R. A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 51(10), 3471 - 3484.

8. Nguyễn Hồng Tâm, Phạm Hùng Vân, Nguyễn Thanh Bảo và Cao Minh Nga. (2015). Khảo sát tác dụng hiệp đồng in vitro của imipenem/colistin và meropenem/colistin đối với vi khuẩn *Acinetobacter baumannii* trong viêm phổi bệnh viện. Tạp chí Y học TP. HCM, 19 (1), 438-444.

9. Tada, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kato, Y., Ohmagari, N., Takeshita, N., Hung, N. V., ... & Kirikae, T. (2013). Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. BMC infectious diseases, 13(1), 251.

10. Van-Belkum, A., Bonetti, E, J. & Cherkaoui, A. (2014). Meropenem/colistin synergy testing for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains by a two-dimensional gradient technique applicable in routine microbiology. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, DOI: 10.1093/jac/dku342.

11. Sopirala, M. M., Mangino, J. E., Gebreyes, W. A., Biller, B., Bannerman, T., Balada-Llasat, J. M., & Pancholi, P. (2010). Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(11), 4678-4683.

12. Nguyễn Sĩ Tuấn, Lưu Trần Linh Đa, Lê Duy Nhất, Hứa Mỹ Ngọc, Nguyễn Ngọc Thanh, Phạm Thị Thu Thủy, Phạm Văn Dũng và Nguyễn Thúy Hương. (2014). Phát hiện các gene bla_{OXA} ở *Acinetobacter baumannii* bằng phương pháp multiplex PCR - ELISA. Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh, 18 (6): 458 - 462.

RESPIRATORY INFECTIONS OF EXTENSIVELY DRUG-RESISTANT *ACINETOBACTER BAUMANNII* CARRYING THE CARBAPENEMASE AND ANTIBIOTIC COMBINATIONS THERAPY

Summary

Background: *Acinetobacter baumannii* are becoming a major cause of respiratory infections and having very high resistance ability to carbapenem. Nowadays, an effective treatment for *Acinetobacter baumannii*carrying the genes encoding the enzyme hydrolyzed carbapenemsis the most important problem for the clinicians.

Objectives: To investigate the resistance ability of *Acinetobacter baumannii* to meropenem, colistin, the rate of *Acinetobacter baumannii* carrying the genes encoding the carbapenemasesand the effectiveness of their combinations on them.

Methods: Retrospective descriptive analysis study. Samples were collected from patients with HAP in Thongnhat Dongnai General Hospital from March 2014 to December 2015.

Results: 110 strains were studied. The resistance rate to meropenem, colistin were 100%, 0% respectively. The rate of carbapenem resistance gene carries with OXA - 51, OXA - 23, OXA - 58 and NDM - 1 respectively 91.7%, 80%, 6.7% and 8.3%. Synergy effects and additive effects of the combinationsare 67% and no antagonism effect. Colistin in concentrations below the MIC had the transfer effect to make meropenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* carrying all of 4 genes (NDM - 1, OXA - 23, OXA - 51 và OXA - 58) encoding the enzyme hydrolyzed carbapenem to susceptible ones.

Conclusions: *Acinetobacter baumannii* had completely resistance to meropenem. The combination of meropenem with colistin showed positve effects on *Acinetobacter baumannii.*

Key words: Meropenem, colistin, combination therapy, genes encoding the carbapenemase, *Acinetobacter baumannii.*