

TÁM GENE MỚI ĐƯỢC PHÁT HIỆN Ở CHỦNG *ACINETOBACTER BAUMANNII* DMS06669 ĐA KHÁNG LÂM SÀNG TẠI MỘT BỆNH VIỆN Ở ĐỒNG NAI

Nguyễn Sĩ Tuấn^{*,}, Hứa Mỹ Ngọc^{*,}, Phạm Thị Thu Hằng^{*,}, Lê Duy Nhất^{*,} Nguyễn Thúy Hương^{*}

TÓM TẮT

Mở đầu: *Acinetobacter baumannii* là một tác nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện quan trọng với khả năng phát triển một loạt các cơ chế kháng đa thuốc khác nhau.

Mục tiêu: Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã giải mã hệ gene chủng *A. baumannii* DMS06669, được phân lập từ đờm của một nam bệnh nhân bị viêm phổi bệnh viện và nghiên cứu tập trung vào việc xác định các gene liên quan tới sự đề kháng kháng sinh.

Phương pháp: Hệ gene *A. baumannii* DMS06669 được giải mã bằng Illumina HiSeq platform, chất lượng được kiểm soát và việc lắp ráp *de novo* cho tổng cộng 24 scaffold, dự đoán gene và chú giải chức năng tiếp theo với các dữ liệu trên thế giới như tRNAscan-SE, RNAmmer, Tandem Repeat Finder, CRISPR Finder, IS Finder và COG, sau đó cây phát sinh loài của chủng *A. baumannii* DMS06669 so với 21 chủng *A. baumannii* trên dữ liệu KEGG được xây dựng.

Kết quả: Việc xác định các gene kháng kháng sinh tiềm năng được tiến hành trên ResFinder cho thấy có 18 gene (với 8 gene chưa từng được ghi nhận ở *Acinetobacter baumannii*) có liên quan tới sự đề kháng 8 lớp kháng sinh.

Kết luận: Các kết quả được thiết lập trong nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ ra rằng cơ chế đề kháng kháng sinh đa dạng, có thể tồn tại ở chủng *A. baumannii* DMS06669 và cung cấp một khuyến cáo lâm sàng cho liệu pháp với các bệnh nhân nhiễm *A. baumannii*.

Từ khóa: *Acinetobacter baumannii*, đa kháng lâm sàng, carbapenem, giải trình tự hệ gene, DMS06669

ABSTRACT

NEW 8 GENES IDENTIFIED AT THE CLINICAL MULTIDRUG-RESISTANT *Acinetobacter baumannii* DMS0669 STRAIN IN DONG NAI HOSPITAL

Nguyễn Sĩ Tuấn, Hứa Mỹ Ngọc, Phạm Thị Thu Hằng, Lê Duy Nhất, Nguyễn Thúy Hương

* Y Học TP. Hồ Chí Minh * Vol. 21 - No 3 - 2017: 23 – 31

Background: *Acinetobacter baumannii* is an important nosocomial pathogen with ability to develop a variety of multidrug resistance (MDR) mechanisms.

Objective: In this study, we characterized the genome of *A. baumannii* DMS06669 strain, which was isolated from the phlegm specimen of a male with hospital acquired pneumonia and focused on identification of genes relevant to antibiotic resistance.

Method: The *A. baumannii* DMS0669 genome was sequenced on Illumina HiSeq platform, quality

*Bộ môn CNSH, khoa Kỹ thuật Hóa học, ĐH Bách Khoa Tpp. HCM - ĐH Quốc Gia Tpp. HCM

** Bệnh viện Đa khoa Thống Nhất Đồng Nai

***Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐH Quốc Gia Tpp. HCM

Tác giả liên lạc: ThS.BS Nguyễn Sĩ Tuấn

ĐT: 0919563323

Email: nsituan@gmail.com

controlled and de novo assembled to produce a total of 24 scaffolds, following gene prediction and functional annotation to public databases such as tRNAscan-SE, RNAmmer, Tandem Repeat Finder, CRISPR Finder, IS Finder and COG, then the phylogeny tree of DMS06669 strain with 21 other *A. baumannii* strains on KEGG database was constructed.

Results: The identification of potential antibiotic resistance genes was conducted on ResFinder yielding 18 genes (with 8 genes have never reported before in *A. baumannii*) related to resistance of 8 antibiotic class.

Conclusion: Our obtained results in this study point out that the diverse possible mechanism of antibiotic resistance, existed in *A. baumannii* DMS06669 strain and provide a clinical advice for the therapy of *A. baumannii* infected patients.

Keywords: *Acinetobacter baumannii* DMS06669, clinical multidrug-resistant, carbapenem, whole-genome sequencing

ĐẶT VẤN ĐỀ

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) đã và đang phát triển trên khắp thế giới như là một tác nhân gây bệnh truyền nhiễm chủ yếu bởi vì loài này có thể thích nghi mạnh mẽ với môi trường và khả năng thiết lập sự đề kháng cao với một số thuốc (đa thuốc)^(1,23,24).

Acinetobacter baumannii chiếm khoảng 2–10% các nhiễm trùng do vi khuẩn Gram âm ở khoa Hồi sức Tích cực (ICU) và làm tăng tỷ lệ tử vong của các bệnh nhân mắc bệnh^(18,26).

Tuy nhiên, sự phát triển khả năng đề kháng đa thuốc ở *A. baumannii*, đặc biệt là kháng carbapenem, đã trở thành một vấn đề của thế giới^(12,33). Những người bị nhiễm các chủng *Acinetobacter* kháng đa kháng có thể có tỷ lệ tử vong cao hơn và thời gian điều trị dài hơn ở bệnh viện hơn những người bị ảnh hưởng bởi các chủng nhạy cảm⁽²⁹⁾.

Các tiến bộ gần đây của công nghệ giải trình tự thế hệ mới tạo điều kiện cho việc xác định nhanh các trình tự hệ gene từ các loài vi khuẩn⁽²¹⁾. Trong nghiên cứu này, để cung cấp cái nhìn sâu sắc về hệ gene và các gene có liên quan đến sự đề kháng kháng sinh của chủng *A. baumannii* DMS06669, chúng tôi đã sử dụng Illumina HiSeq® platform để lắp ráp de novo bộ dữ liệu hệ gene chủng *A. baumannii* bằng cách dùng mẫu ADN từ bệnh phẩm đờm của một nam bệnh nhân bị viêm phổi bệnh viện. Các

scaffold đã lắp ráp được dự đoán và chú giải dựa trên các cơ sở dữ liệu đã công bố trên thế giới, sau đó là xây dựng cây phát sinh loài và so sánh toàn bộ hệ gene. Hơn nữa, khả năng đề kháng của DMS06669 đối với đa kháng sinh được xác định thông qua xét nghiệm thử nghiệm nhạy cảm kháng sinh và các gene kháng kháng sinh tiềm năng trong DMS06669 cũng được dự đoán từ việc phân tích chú giải chức năng. Việc xác định các gene này cung cấp thông tin giá trị để làm sáng tỏ các cơ chế đề kháng kháng sinh trong chủng *A. baumannii* DMS06669, và nó mở ra khả năng định hướng làm sáng cho việc điều trị cho bệnh nhân nhiễm *A. baumannii*.

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phân lập và định danh chủng *A. baumannii*

Chủng *Acinetobacter baumannii* lâm sàng, DMS06669, được phân lập từ bệnh phẩm đờm của một bệnh nhân nam sinh năm 1986 bị viêm phổi bệnh viện và chủng được lưu trữ tại phòng thí nghiệm Y sinh học Phân tử, khoa Vi sinh, Bệnh viện Đa khoa Thống Nhất Đồng Nai, Việt Nam.

Mẫu đờm được cấy phân lập trên môi trường Blood Agar (BA) và MacConkey (MC). Các phân lập *A. baumannii* được tiếp tục chọn lọc bằng cách kiểm tra sự hiện diện của *bla*_{OXA-51} nội tại⁽¹⁶⁾.

Xét nghiệm thử nghiệm nhạy cảm kháng sinh với *A. baumannii*

Chủng *Acinetobacter baumannii* DMS06669 được định danh và thử nghiệm nhạy cảm kháng sinh bằng hệ thống định danh và kháng sinh đồ tự động Phoenix, BD. Các kháng sinh được xác định điểm gây MIC đối với chủng DMS06669 này bao gồm amikacin, aztreonam, ampicillin/sulbactam, ciprofloxacin, ceftazidime, cefpodoxime, cefotaxime, ceftriaxone, colistin, ceftazidime, cefepime, cefoxitin, ceftazolin, gentamicin, imipenem, meropenem, levofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ticarcillin/clavulanic acid, tigecycline, and piperacillin/tazobactam.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra các đặc tính vật lý của trình tự tự môi

STT	Tên môi	Trình tự	Chiều dài (bp)	GC (%)	Tm (°C)	Hairpin-loop Kcal/mol	Self-dimer Kcal/mol
1	16s F	TGCAATCGATACTGGTGAGC	20	50	55	0.63	-3.14
2	16s R	CTAGTATGTCAAGGCCAGGTAAG	23	47.8	54.5	1.2	0.0
3	OXA23 F	AAATGTTGAATGCCCTGATCGGATTG	26	42.3	58.1	-0.58	-3.42
4	OXA23 R	ATCCATTGCCCAACCAGTCTTTCC	24	50	59.7	0.94	0.0
5	OXA51 F	ACCATAAGGCCAACCCACAGAAAG	24	50	59.3	-0.52	0.0
6	OXA51 R	ATCTGCATTGCCATAACCAACACG	24	45.8	58.3	0.31	-3.61
7	OXA58 F	TCAAGAAATGGCACGTCGATTGG	24	45.8	57.7	-0.79	0.0
8	OXA58 R	AAACCCACATACCAACCCACTTG	23	47.8	57.7	0.12	-3.9
9	NDM-1 F	CGATTGGCCAGCAAAATGGAACTG	24	50	59.3	-2.18	-3.55
10	NDM-1 R	CATACCGCCCATCTTGTCCTGATG	24	54	59.6	-0.87	-5

Bảng 2 Kết quả khuếch đại in silico xác định vị trí bắt cặp và kích thước sản phẩm PCR

STT	Tên môi	Vị trí bắt cặp	Kích thước sản phẩm
1	16S F	755-777	370 bp
	16S R	1106-1125	
2	OXA23 F	213-238	422 bp
	OXA23 R	611-634	
3	OXA51 F	24-47	194 bp
	OXA51 R	194-217	
4	OXA58 F	369-392	306 bp
	OXA58 R	652-674	
5	NDM-1 F	427-450	287 bp
	NDM-1 R	690-713	

Tách chiết DNA, xây dựng thư viện và giải trình tự

DNA được tách chiết từ khuẩn lạc của chủng

Xác định nhóm gene đề kháng carbapenem ở *A. baumannii*

PCR đa mồi phát hiện các gene mã hóa Carbapenemase (OXA-23, OXA-51, OXA-58 và NDM-1) được thiết kế mồi (Bảng 1 và Bảng 2), với thành phần phản ứng gồm: Taq DNA polymerase là 1,25 u/phản ứng; Buffer là 1X/phản ứng; Primer là 0,15 μ M mỗi loại/phản ứng; dNTP là 0,25mM/ phản ứng; DNA mẫu là 5 μ l; DEPC vừa đủ 25 μ l phản ứng. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR đa mồi gồm: 95°C trong 10 phút; 94°C trong 45 giây; 58°C trong 45 giây; 72°C trong 60 giây; 72°C trong 5 phút và lặp lại 40 chu kỳ.

Acinetobacter baumannii DMS06669 bằng bộ kit tách chiết DNA Wizard, theo khuyến cáo của nhà sản xuất (Promega, Mỹ) và sau đó, mẫu DNA này được giải trình tự toàn bộ hệ gen bằng hệ thống máy Platform HiSeq 150E với kích thước trình tự đọc là 150bp và độ bao phủ 120x.

Tiền xử lý dữ liệu và lắp ráp de novo hệ gene

Trình tự đọc thô được đánh giá và kiểm soát chất lượng bằng FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) và Trimmomatic[®] (các thông số: ILLUMINACLIP: 2:30:10 LEADING: 3 TRAILING: 3 SLIDINGWINDOW:10:30 MINLEN:100) để có được trình tự đọc tinh sạch. Sau khi tiền xử lý, FastQC được sử dụng lại để

báo cáo các đặc điểm của các thư viện tiên xử lý và xác định tính hiệu quả của việc loại bỏ các trình tự chất lượng kém.

Sau khi lọc, các trình tự ngắn được lắp ráp bằng bộ sắp xếp hệ gene SPAdes và các contig với chiều dài hơn 300bp vẫn được giữ nguyên. Sau đó, những contig này được đưa vào 1 phân tích dựa trên nhiều bản thô để sắp xếp lại thông qua bộ scaffold MeDuSa⁽⁷⁾, bằng cách sử dụng *A. baumannii* ATCC 17978 là hệ gene tham chiếu.

Chú giải hệ gene

Phần mềm Prodigal (v2.6.2)⁽¹⁵⁾ là một hệ thống để xác định các gene trong các trình tự AND của vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn và virus, được sử dụng để dự đoán gene trong hệ gene thô của *A. baumannii* DMS06669, trong khi tRNAscan-SE⁽¹⁹⁾ và RNAmmer⁽¹⁷⁾ được sử dụng để lần lượt xác định tRNA và rRNA (5S, 16S và 23S).

Hơn nữa, hai máy chủ trực tuyến Tandem Repeat Finder (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>)⁽²⁾ và CRISPR Finder (<http://crispr.u-psud.fr/Server/>)⁽¹³⁾ lần lượt được sử dụng để dự đoán các trình tự lặp đi lặp lại và phát hiện các CRISPR trong trình tự hệ gene.

Ngoài ra, các trình tự hệ gene được so sánh với cơ sở dữ liệu các trình tự chèn (IS) để xác định máy chủ IS Finder (<https://www-biotoul.fr/>).

Để phân loại chức năng của các gene đã dự đoán, BLASTp⁽²¹⁾ được sắp xếp để giống các axit amin của các gene đã dự đoán so với các dữ liệu COG⁽³⁰⁾ với giá trị mong đợi < 10e-3 bằng cách dùng máy chủ CDD-batch⁽²⁰⁾ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>). Các trình tự axit amin được giống với thông số mặc định và việc mô tả chất lượng tốt nhất (với tỷ lệ % chiều dài giống cao nhất và tương ứng tương đồng với nhau) được dùng để chú thích các gene đã dự đoán. Tất cả các gene đã chú giải sau đó được phân loại dựa trên các lớp COG của chúng.

Để tìm kiếm các gene kháng thuốc kháng sinh, các trình tự gene đã dự đoán của DMS06669 được tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu ResFinder

(<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (v 2.1) bằng cách sử dụng ngưỡng tương tự như khuyến cáo trong trang web ResFinder. Sau đó, cây phát sinh loài được xây dựng bằng cách dùng gói PHYLIP (v 3.695) với thuật toán bootstrap được thiết kế là 500 và cây phát sinh loài được hình ảnh hóa bằng phần mềm FigTree (v1.4.3) (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Sự đề kháng kháng sinh của *Acinetobacter baumannii*

Đặc điểm nhạy cảm kháng sinh đối với chủng DMS06669 được thể hiện trong Bảng 3. Kết quả này cho thấy chủng DMS06669 đã kháng đối với hầu hết các kháng sinh thử nghiệm, ngoại trừ colistin và tigecycline. Ở mức độ trung gian, các giá trị MIC của Ciprofloxacin, Levofloxacin và Clavulanic acid đều là 4 µg/ml.

Bảng 3. Thử nghiệm nhạy cảm 17 loại kháng sinh vào *Acinetobacter baumannii* DMS06669

Tên kháng sinh	Điểm gây MIC (µg/ml)
Colistin	1
Tigecycline	1
Ciprofloxacin	4
Levofloxacin	4
Ceftriaxone	8
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	8/76
Imipenem	16
Meropenem	16
Gentamicin	16
Cefazolin	16
Ampicillin/Sulbactam	32
Ceftazidime	32
Cefepime	32
Cefoxitin	32
Aztreonam	32
Amikacin	64

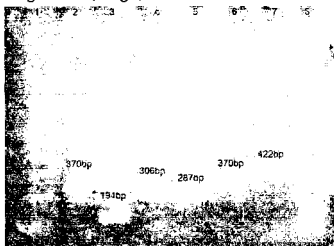
Tên kháng sinh	Điểm gây MIC ($\mu\text{g/ml}$)
Piperacillin/Tazobactam	128/8
Ticarcillin/Clavulanic acid	128/4

Các gene mã hóa enzyme carbapenemase của *Acinetobacter baumannii* DMS06669

Chủng *Acinetobacter baumannii* DMS06669 mang 4 gene mã hóa carbapenemase, gồm 3 gene mã hóa oxacillinase thuộc carbapenemase Ambler lớp D và 1 gene mã hóa New-Delhi-Metallo-Beta-lactamase-1 (NDM-1) thuộc carbapenemase Ambler lớp B. Chủng *Acinetobacter baumannii* đồng nhiễm 4 gene mã hóa carbapenemase được đề cập trong nghiên cứu này là ghi nhận đầu tiên, không chỉ ở Việt Nam mà còn trên cả thế giới (Hình 1).

Lắp ráp và chú giải trình tự hệ gene

Bộ dữ liệu đọc được làm sạch và đã ghép cặp được sử dụng để lắp ráp *de novo* hệ gene bằng cách dùng bộ lắp ráp hệ gene SPAdes và sắp xếp lại bằng Medusa, kết quả cho 24 scaffold, với tổng chiều dài của hệ gene là 4.369.281 bp; N50 là 4.207.939 bp và hàm lượng GC là 38,91%. Từ phân tích chú giải hệ gene, đã phát hiện được 4.101 trình tự mã hóa, 63 trình tự tRNA, 3 trình tự rRNA; 2 CRISPR và 6 trình tự lắp lại song song ở 2 đầu (Bảng 4).



Hình 1. Kết quả điện di (gel agarose 2%) sản phẩm PCR khuếch đại các đoạn gene mã hóa Oxacillinase và NDM-1 ở *Acinetobacter baumannii*

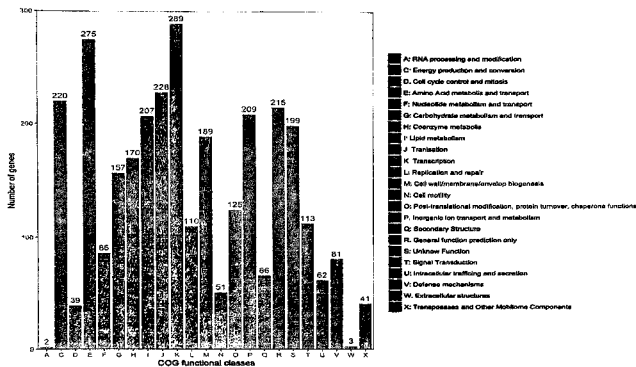
DMS06669. Đại diện gene 16S-RNA (vạch số 2), blaOXA-51 (vạch số 3), blaOXA-58 (vạch số 4), blaNDM-1 (vạch số 5), gene 16S-RNA chủng ATCC 19606 (vạch số 6), blaOXA-23 (vạch số 7). DNA ladder là các vạch số 1 và số 8.

Bảng 4. Kết quả lắp ráp và chú giải bộ gene của *Acinetobacter baumannii* DMS06669

Đặc điểm	Thông kê
Pair-end raw reads	4.750.865
Pair-end clean reads (Tỷ lệ % còn lại)	3768594 (79,32%)
Tổng chiều dài của hệ gene thô (bp)	4.369.281
Số lượng scaffold	24
Chiều dài của scaffold (N50)	4.207.939
Hàm lượng GC (%)	38,91
Số lượng trình tự mã hóa	4.101
Số lượng tRNAs	63
Số lượng rRNAs	3
Số lượng CRISPR	2
Số lượng trình tự lắp lại 2 đầu	6
Số lượng các trình tự chèn	62

Chú giải chức năng của trình tự hệ gene *Acinetobacter baumannii*

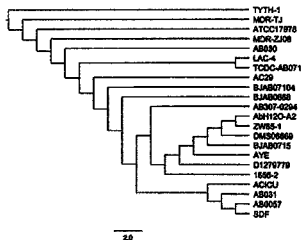
Chức năng của trình tự hệ gene *Acinetobacter baumannii* DMS06669 chủ yếu lần lượt từ là nhóm phiên mã, trao đổi và vận chuyển axit amin, chuyển hóa và sản xuất năng lượng, dịch mã, các con đường trao đổi chất và vận chuyển ion bên trong tế bào. Các nhóm chức năng còn lại có số lượng gene tương đối bằng nhau. Riêng hai nhóm: Chính sửa và xử lý RNA; Cấu trúc ngoại bào có rất ít gene tương đồng.



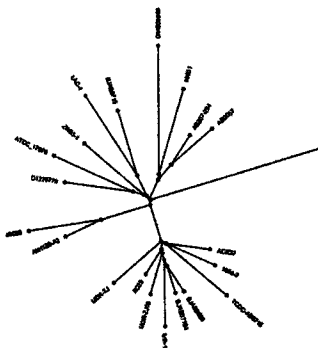
Hình 2. Phân loại chức năng gen trên cơ sở dữ liệu COG

Phân tích cây phân loài và các hệ gene so sánh

Dựa trên các hệ gene từ các chủng *Acinetobacter baumannii* đã được công bố trên dữ liệu KEGG, tiến hành phân tích cây phân loài dựa trên 16S-rRNA để xác định quan hệ di truyền của các chủng. Hình 3 cho thấy phát sinh loài của chủng DMS06669 liên quan gần với chủng ZW-85 và AbH120-A2.



Hình 3. Phân tích cây phân loài 16S-rRNA cho thấy mối liên hệ tiến hóa giữa *A. baumannii* DMS06669 và các chủng *A. baumannii* khác.



Hình 4. Cây phân loài của các hệ gene của *A. baumannii* DMS06669 và 21 hệ gene *A. baumannii* khác:

Để hiểu rõ hơn mối liên quan giữa chủng DMS06669 và các chủng *A. baumannii* toàn cầu

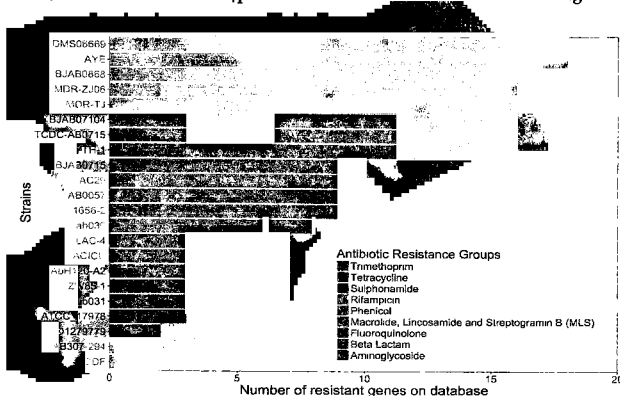
Bảng 5. Ở gene đề kháng kháng sinh được xác định bằng ResFinder

Gene đã dự đoán	Gene kháng	Lớp kháng sinh bị kháng	Tương đồng (%)	Chiều dài HSP/Query
DMS06669_scf_4_1	<i>aadA16</i>	Aminoglycoside	99,65	846 / 846
DMS06669_scf_2_1	<i>aadB</i>	Aminoglycoside	100	534 / 534
DMS06669_scf_23_3	<i>aadA1</i>	Aminoglycoside	99,87	792 / 792
DMS06669_scf_22_2	<i>rrtB</i>	Aminoglycoside	100	756 / 756
DMS06669_scf_2_2	<i>blaVEB-7</i>	Beta-lactam	99,89	900 / 900
DMS06669_scf_23_2	<i>blaOXA-10</i>	Beta-lactam	100	801 / 801
DMS06669_scf_18_1	<i>blaOXA-58</i>	Beta-lactam	100	843 / 843
DMS06669_scf_1_2828	<i>blaADC-25</i>	Beta-lactam	96,35	1152 / 1152
DMS06669_scf_11_9	<i>blaNDM-1</i>	Beta-lactam	100	813 / 813
DMS06669_scf_1_1731	<i>blaOXA-64</i>	Beta-lactam	100	825 / 825
DMS06669_scf_23_1	<i>cmiA1</i>	Phenicol	99,13	1260 / 1260
DMS06669_scf_21_2	<i>floR</i>	Phenicol	98,35	1214 / 1215
DMS06669_scf_5_1	<i>sul1</i>	Sulphonamide	100	840 / 840
DMS06669_scf_8_3	<i>tet(39)</i>	Tetracycline	99,91	1122 / 1122
DMS06669_scf_13_10	<i>mph(E)</i>	Macrolide	100	885 / 885
DMS06669_scf_13_11	<i>msr(E)</i>	Macrolide, Lincosamide và Streptogramin B	100	1476 / 1476
DMS06669_scf_16_1	ARR-3	Rifampicin	100	453 / 453
DMS06669_scf_4_2	<i>dfrA27</i>	Trimethoprim	100	474 / 474

khác, một cây phân loài hệ gene dựa trên thuật toán neighbor-joining, được tiến hành dựa trên hệ gene của *Acinetobacter baumannii* DMS06669 và 21 hệ gene khác có giá trị từ dữ liệu KEGG dùng Progressive Mauve. Kết quả từ hình 4 cho thấy DMS06669 thuộc chủng quốc tế II (International Clone II, IC II).

Xác định các gene đề kháng với kháng sinh

Để xác định các gene liên quan tới sự đề kháng với kháng sinh của *A. baumannii* DMS06669, các trình tự mã hóa được nhập vào cả dữ liệu ResFinder. Bảng 5 liệt kê các gene có liên quan đến sự đề kháng của chủng *A. baumannii* DMS06669 đối với các aminoglycoside, betalactam, macrolide, lincosamide streptogramin B, phenicol, rifampicin, sulphonamide, tetracycline, trimethoprim.



Hình 5. Các nhóm đề kháng kháng sinh của *A. baumannii* DMS06669 và 21 chủng *A. baumannii* (được tải từ cơ sở dữ liệu KEGG) bằng ResFinder.

Chủng *A. baumannii* DMS06669 chiếm số lượng lớp kháng kháng sinh cao nhất trong tổng số 22 chủng *A. baumannii* từ việc tìm kiếm trong ResFinder (8/9 lớp kháng sinh, ngoại trừ lớp Fluoroquinolon) (Hình 5), tiếp theo là các chủng AYE, BJAB0868, MDR-ZJ06, MDR-TJ và BJAB07104, tất cả đều đã được báo cáo là các chủng đa kháng thuốc. Việc thiếu sự đề kháng lớp kháng sinh Fluoroquinolon trong chủng DMS06669 phù hợp với phân tích MIC (Bảng 3), khi giá trị MIC của Ciprofloxacin, Levofloxacin đều ở mức trung gian là 4 µg/ml.

Để hiểu sâu sắc hơn về lớp Aminoglycoside, có hai gen (*aadB*⁽⁹⁾ và *rmtB*⁽³⁰⁾) liên quan đến tính kháng Gentamicin và Amikacin trong chủng *A. baumannii* DMS06669. Các giá trị MIC của Gentamicin và Amikacin cũng thực sự cao với lần lượt là 16 và 64 µg/ml (Bảng 3). Đặc biệt, *rmtB* là gen kháng aminoglycosid mà trước đây chưa từng được báo cáo trong *A. baumannii*. Ngoài ra, chúng tôi cũng đã khảo sát *aadA1*⁽³⁴⁾ và *aadA16* (chưa bao giờ được báo cáo trong *A. baumannii* trước đó)⁽³¹⁾, liên quan đến sự kháng streptomycin và spectinomycin.

Trong lớp đề kháng kháng sinh MLS (Macrolide, Lincosamide và Streptogramin B), có hai gene *mphE*⁽³⁾ và *msrE*⁽⁶⁾, liên quan đến sự đề kháng với erythromycin (macrolisade) và streptogramin. Các kết quả này cũng được báo cáo ở các chủng đa kháng thuốc khác như BJAB0868, BJAB07104, TYTH-1, MDR-ZJ06, AC29, MDR-TJ.

Trong các nhóm Phenicol, Rifapicin và Sulphonamide, bên cạnh một số gene tìm thấy trong *A. baumannii* như *cmlA1* liên quan đến sự đề kháng chloramphenicol⁽⁴⁾ và *sulI* liên quan đến kháng Sulfamethoxazole⁽²⁸⁾, chúng tôi cũng xác định hai gene chỉ xuất hiện trong dòng DMS06669 như *floR* chloramphenicol và kháng phenicol⁽¹⁾ và rifampin (Rifampicin), rifaximin, rifabutin, kháng rifapentine nhóm⁽¹⁰⁾.

Có hai gene dự đoán của DMS06669 tương tự như *tet*⁽²²⁾ và *dfrA27* thuộc các lớp Tetracycline và Trimethoprim. Những gene này chưa bao giờ được báo cáo trong *A. baumannii* trước đây. Gene *tet*⁽²²⁾ được báo cáo là sự đề kháng với Tetracycline có cấu trúc tương tự với Tigecycline nhưng hoạt động cao hơn 5 lần. Tuy nhiên, theo

phân tích của MIC (Bảng 3), DMS06669 kháng Tigecycline (1 µg/ml) có nghĩa là tet⁽²³⁾ không liên quan đến kháng Tigecycline. Dữ liệu cũng khẳng định rằng gene *dfrA27* có liên quan đến kháng Trimethoprim và phức hợp của các gen *dfrA27* và *aadA16* đã được tìm thấy trong chủng *E.coli* 1387 đa kháng thuốc⁽⁶¹⁾. Phức hợp này được xác định có trong chủng DMS06669.

Thật thú vị, có 8 gene được xếp vào nhóm đề kháng với kháng sinh beta-lactamase. Gen *blaVEB7* có liên quan đến kháng cephalosporin (Cefepime, Cefoxitin, Cefazolin, Ceftriaxone) và kháng thuốc aztreonam⁽²⁵⁾. Điều này phù hợp với phân tích MIC (Bảng 3). Năm gene *blaOXA-10*⁽²²⁾, *blaOXA-58*⁽³⁷⁾, *blaOXA-64*⁽⁶⁾ và *blaNDM-1*⁽²²⁾ được coi là các gene kháng thuốc của nhóm kháng sinh carbapenems (meropenem và imipenem). Trong số đó, *blaOXA-64* chưa bao giờ công bố trước đây trong các chủng *A. baumannii*. Và thú vị hơn, cả gen *NDM-1* và *blaOXA-58* tìm thấy trong DMS06669 chưa bao giờ được báo cáo trong cùng một chủng trước đó.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, hệ của chủng *Acinetobacter baumannii* DMS06669 đã được giải mã và lắp ráp *de novo* với 24 scaffold. Việc phân tích sự phát sinh loài đã được tiến hành từ trích xuất 16S rRNA từ hệ gene đã được lắp ráp. Có 4,101 trình tự mã hóa được dự đoán và chú thích với các cơ sở dữ liệu trực tuyến khác nhau như tRNAscan-SE, RNAmmer, Tandem Repeat Finder, CRISPR Finder, IS Finder, COG và ResFinder. Theo đó, chúng tôi xác định được 18 gene dự đoán (trong đó có 8 gene mới chưa từng được báo cáo trước đây ở *A. baumannii*) có liên quan đến sự đề kháng của 8 nhóm kháng sinh. Hơn nữa, có hai gene kháng thuốc kháng sinh được tìm thấy trong dòng DMS06669 chưa bao giờ được báo cáo trong một dòng *A. baumannii* trước đây. Phân tích hệ gene này mở rộng đáng kể các thông tin gene hiện có ở *A. baumannii* và cung cấp hỗ trợ nền tảng cho các nghiên cứu

trong tương lai về cơ chế phân tử đề kháng kháng sinh ở loài vi khuẩn nguy hiểm này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arcangeli M.A., et al., (1999) A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. *FEMS Microbiology Letters*, 174(2): pp. 327-332.
2. Benson G., (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 27(2): pp. 573-580.
3. Bhullar K., et al., (2012) Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS one*, 7(4): pp. e34953.
4. Bissonnette L., et al., (1991) Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (*crmA*) gene of the *Int4* integron of *Tn1696*: similarity of the product to transmembrane transport proteins. *Journal of bacteriology*, 1991, 173(14): pp. 4493-4502.
5. Bolger A.M., M. Lohse, and B. (2014) Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014: pp. btu170.
6. Bonnin R.A., et al., (2013) Comparative genomics of *IncI/M*-type plasmids: evolution by acquisition of resistance genes and insertion sequences. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2013 57(1): pp. 674-676.
7. Bosi E., et al., (2013) McDuSa: a multi-draft based scaffold. *Bioinformatics*, 2015: pp. btt171.
8. Brown S., and Amyes S., (2005) The sequences of seven class D β -lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clinical microbiology and infection*, 11(4): pp. 326-329.
9. Cameron F.H., et al., (1986) Nucleotide sequence of the AAD (2') aminoglycoside adenylyltransferase determinant *aadB*. Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and *dhfrII* in R388. *Nucleic acids research*, 1986, 14(21): pp. 8625-8635.
10. Chowdhury G., et al., (2011) Transferable plasmid-mediated quinolone resistance in association with extended-spectrum β -lactamases and fluoroquinolone-acetylating aminoglycoside-6'-N-acetyltransferase in clinical isolates of *Vibrio fluvialis*. *International journal of antimicrobial agents*, 38(2): pp. 169-173.
11. Dijkshoorn L., A. Nemec, and H. Seifert, (2007) An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology*, 5(12): pp. 939-951.
12. Falagas M. and Karveli E., (2007) The changing global epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections: a development with major public health implications. *Clinical microbiology and infection*, 13(2): pp. 117-119.
13. Grissa I., Vergnaud G. and Pournel C., CRISPRfinder (2007): a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic acids research*, 35(suppl 2): pp. W52-W57.
14. Hollingshead S. and Vapnek D., (1985) Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase. *Plasmid*, 13(1): pp. 17-30.
15. Hyatt D., et al., (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11: pp. 119-119.
16. Kinzler K.W., et al. (1987), Identification of an Amplified, Highly Expressed Gene in a Human Glioma. *Science*, 236.

17. Lagesen K, et al. (2007). RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic acids research*, 35(9): pp. 3100-3108.
18. Lockhart S.R., et al., (2007) Antimicrobial Resistance among Gram-Negative Bacilli Causing Infections in Intensive Care Unit Patients in the United States between 1993 and 2004. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10): pp. 3352-3359
19. Lowe T.M. and S.R. Eddy, (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic acids research*, 25(5): pp. 955-964
20. Marchler-Bauer, A., et al., (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic acids research*, 39(suppl 1): pp. D225-D229.
21. Metzker M.L. (2010), Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1): pp. 31-46.
22. Paetzel M., et al., (2000) Crystal structure of the class D β -lactamase OXA-10. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7(10): pp. 918-925.
23. Peleg A.Y., H. Seifert, and D.L. (2008) Paterson, *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3): pp. 538-582.
24. Poirel L. and P.P. Nordmann, (2006) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(9): pp. 826-836.
25. Poirel L., et al., (1999) Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(3): pp. 573-581
26. Poirel L., et al., (2003) Outbreak of Extended-Spectrum β -Lactamase VEB-1-Producing Isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8): pp. 3542-3547.
27. 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): pp. 202-208.
28. Sköld O., (2011) Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary research*, 32(3-4): pp. 261-273.
29. Sunenshine R.H., et al., (2007) Multidrug-resistant *Acinetobacter* Infection Mortality Rate and Length of Hospitalization. *Emerging Infectious Diseases*, 13(1): pp. 97-103.
30. Tatusov, R.L., et al., (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC bioinformatics*, 4(1): pp. 41.
31. Wei Q., et al., *dfrA27*, a new integron-associated trimethoprim resistance gene from *Escherichia coli*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63(2): pp. 405-406.
32. Yong D., et al., (2009) Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(12): pp. 5046-5054.
33. Zarrilli R., et al., (2013) Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *International journal of antimicrobial agents*. 41(1): pp. 11-19.
34. Zhou Y., et al., (2010) Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 29(11): pp. 1349-1353.

Ngày nhận bài báo: 07/04/2017

Ngày phản biện nhận xét bài báo: 14/04/2017

Ngày bài báo được đăng: 15/05/2017