

MỐI TƯƠNG ĐỒNG KIỂU GEN CỦA CÁC CHỦNG ACINETOBACTER BAUMANNII PHÂN LẬP TRÊN BỆNH NHÂN NHIỄM KHUẨN HUYẾT BẰNG KỸ THUẬT ĐIỆN DI XUNG TRƯỜNG (PFGE)

Nguyễn Thị Thanh Hà¹, Hoàng Thị Thu Hà², Phan Quốc Hoàn³

Tóm tắt

Mục đích: Tìm hiểu mối tương đồng về kiểu gen của các chủng *Acinetobacter baumannii* gây nhiễm khuẩn huyết phân lập được tại một số bệnh viện lớn của Việt Nam.

Đối tượng và phương pháp: 73 chủng *A. baumannii* được phân lập trên bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết tại 6 bệnh viện lớn cả 3 miền Bắc, Trung, Nam. Thời gian nghiên cứu từ tháng 6/2011 đến tháng 6 năm 2013.

Kết quả: Sử dụng kỹ thuật PFGE phân tích 73 chủng *A. baumannii* phân lập từ 6 bệnh viện đã cho thấy có 16 cụm (Cluster) vi khuẩn được ký hiệu từ I đến XVI với mức độ tương đồng về kiểu gen của các chủng *A. baumannii* này từ 89,5 % tới 100 %. Các chủng *A. baumannii* kháng với nhóm carbapenem phân lập được có kiểu gen tương đồng trên 90% nằm rải rác ở cả 6 bệnh viện. Các chủng *A. baumannii* phân lập được tại khoa Hồi sức tích cực của Bệnh viện TƯ Huế có sự tương đồng kiểu gen rất cao.

Từ khóa: kiểu gen, *Acinetobacter baumannii*, PFGE

ABSTRACT

TYPING ACINETOBACTER BAUMANNII ISOLATED FROM SEPSIS PATIENTS BY PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)

Nguyen Thi Thanh Ha¹, Hoang Thi Thu Ha², Phan Quoc Hoan³

Objectives: To investigate the relationship of genotype from *Acinetobacter baumannii* strains isolated from sepsis patients in Vietnam.

Subjects and Methods: 73 strains of *A. baumannii* isolate from in patients with sepsis in 6 major hospitals in Northern, Central and Southern Vietnam. Study period from 6/2011 to June 2013.

Results: Using PFGE analysis on 73 *A. baumannii* strains isolated from six hospitals, 16 clusters *A. baumannii* have been found marked from I to XVI. The level of similarity between genotypes of *A. baumannii* was 89.5%- 100%. *A. baumannii* strains resistant to carbapenem with similar genotypes were scattered over 90% in the six hospitals. The strains isolated in the ICU at Hue Central Hospital have very high genotype resemblance.

Key words: Genotype, *Acinetobacter baumannii*, PFGE

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) là một trong những vi khuẩn Gram âm hiện nay được

quan tâm nhiều vì khả năng gây bệnh nặng, kháng lại nhiều kháng sinh thường dùng, và tỷ lệ tử vong cao hơn so với các trường hợp nhiễm khuẩn do các

1: Bệnh viện Nhi Đồng 1- TP Hồ Chí Minh

2: Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

3: Bệnh viện TƯQĐ 108- Hà Nội

- Ngày nhận bài (received): 23/7/2015; Ngày phản biện (revised): 31/7/2015;

- Ngày đăng bài (Accepted): 12/8/2015

- Người phản biện: Phạm Như Hiệp

- Người phản hồi (Corresponding author):

- Email: phan_hoan2002@yahoo.com; Điện thoại: 0989530699

tác nhân khác [2], [3]. *A. baumannii* có đặc tính sinh học đặc biệt, đó là tạo ra các màng sinh học (biofilm) giúp vi khuẩn gắn chặt vào bề mặt dụng cụ, môi trường và tạo điều kiện cho vi khuẩn dễ dàng tồn tại lâu dài, thu nhận, tích lũy gen kháng kháng sinh và trở thành tác nhân gây khó khăn trong điều trị và kiểm soát lây nhiễm [4].

Hiện nay, có nhiều phương pháp sinh học phân tử giúp xác định nguồn gốc và cách lây truyền của các chủng *A. baumannii* phân lập được. Tuy vậy, kỹ thuật điện di xung trường (PFGE) vẫn được xem là “tiêu chuẩn vàng - gold standard” trong phân loại, xác định nguồn gốc vi khuẩn không chỉ riêng cho *Acinetobacter* mà còn cho nhiều loại mầm bệnh vi khuẩn khác [2], [4]. Chúng tôi sử dụng kỹ thuật PFGE, với mục đích tìm hiểu mối tương đồng về kiểu gen của các chủng *Acinetobacter baumannii* gây nhiễm khuẩn huyết phân lập được tại một số bệnh viện lớn của Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chủng vi khuẩn: 73 chủng *A. baumannii* được phân lập trên bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết tại 6 bệnh viện lớn cả 3 miền Bắc, Trung, Nam. Thời gian nghiên cứu từ tháng 6/2011 đến tháng 6/2013.

2.2. Kỹ thuật điện di xung trường PFGE: Thực hiện tại phòng xét nghiệm Vi khuẩn học, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, Hà Nội, cụ thể như sau:

- Pha loãng và đo độ đục vi khuẩn: chủng *A. baumannii* đã được định danh sẽ được nuôi cấy trên

môi trường thạch dinh dưỡng, sau đó được lấy ra hòa vào thạch lỏng rồi đổ vào những khuôn nhỏ.

- Gắn vi khuẩn vào thạch: miếng thạch sau khi đổ được cắt và tạo các nút thạch nhỏ chứa toàn bộ tế bào vi khuẩn.

- Ly giải và cắt ADN của vi khuẩn bằng Protein K và XbaI: vi khuẩn được cố định trong thạch sẽ chịu tác dụng của Protein K sẽ ly giải tế bào vi khuẩn giải phóng toàn bộ ADN, tiếp theo ADN của vi khuẩn sẽ bị gián hóa dưới tác dụng phân cắt tại những vị trí đặc hiệu bởi enzym giới hạn XbaI.

- Điện di thực hiện bằng máy điện trường xung (PFGE): các nút thạch chứa ADN *A. baumannii* sau khi được phân cắt, đặt vào các giếng tương ứng trên khuôn thạch agarose và tiến hành điện di. Quá trình điện di được thực hiện với dòng điện thay đổi ở các khoảng xác định trước sao cho điện trường cho phép các đoạn ADN có kích thước lớn khoảng 10 - 800 kb phân tách rời được với nhau.

- Nhuộm gel và chụp ảnh: mẫu thạch sau điện di sẽ được nhuộm với thuốc nhuộm huỳnh quang như ethidium bromide và quan sát dưới đèn cực tím (UV light). Hình ảnh bộ gen của VK được chụp bằng máy chụp GelDoc (BIO-RAD).

2.3. Xử lý số liệu: Số liệu được quản lý bằng phần mềm excel. Phân tích chùm VK bằng phần mềm Fingerprinting II (BIO-RAD). Các chùm VK được thể hiện qua biểu đồ cây (dendrogram). Các chủng *A. baumannii* có mức độ tương đồng về kiểu gen ADN $\geq 90\%$ được xem có quan hệ di truyền chặt chẽ.

III. KẾT QUẢ

3.1. Tương đồng kiểu gen của 73 chủng *A.baumannii*

Bảng 3.1. Mức độ tương đồng về kiểu gen của *A.baumannii*

Chùm	Số VK n (%)	Tương đồng* (%)	Bệnh viện**					
			108	BM	TWH	TV	CR	ND
I	2 (2,7)	94,4					2	
II	2 (2,7)	100				2		
III	2 (2,7)	100			1			1
IV	13 (17,8)	96,4		1	8		2	2
V	2 (2,7)	90,3					1	1

VI	2 (2,7)	96,8			1		1	
VII	2 (2,7)	91,9					1	1
VIII	4 (5,4)	90,9			2	1		1
IX	2 (2,7)	91,4						2
X	2 (2,7)	100	2					
XI	2 (2,7)	90		1				1
XII	2 (2,7)	100	2					
XIII	4 (5,4)	89,5	3	1				
XIV	2 (2,7)	97,1		2				
XV	2 (2,7)	100						2
XVI	5 (6,8)	92		1	4			
Tổng			7	6	16	3	7	11

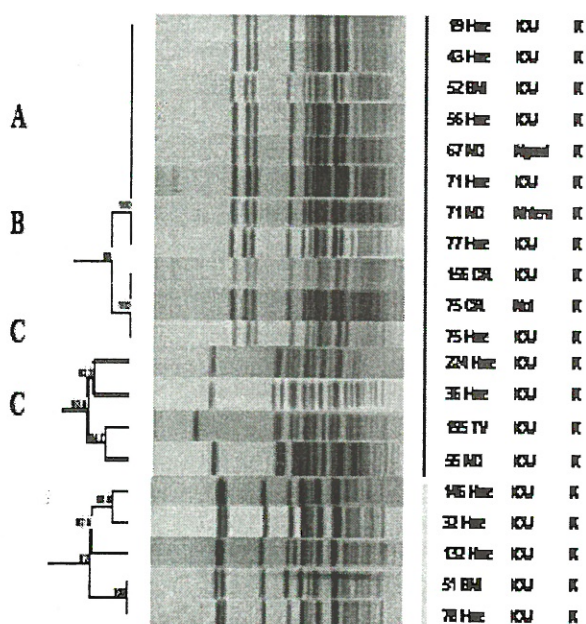
*Tương đồng về kiểu gen: về phương diện dịch tễ học sinh học phân tử, độ tương đồng về kiểu gen càng lớn thì càng có nhiều khả năng có chung một nguồn gốc.

**108: Bệnh viện 108, BM: Bệnh viện Bạch Mai, TWH: Bệnh viện TƯ Huế, TV: Bệnh viện Trung Vương, CR: Bệnh viện Chợ Rẫy, ND: Bệnh viện Nhi đồng I.

Bảng 3.1 cho thấy có 16 chùm gen được ký hiệu từ I đến XVI với mức độ tương đồng về kiểu gen ADN thay đổi từ 89,5 % - 100 %, đặc biệt có chùm tương đồng là 96,8%; trong đó có 8/13 chủng phân lập ở Bệnh viện TƯ Huế và 05 chủng còn lại được phân lập ở bệnh viện Bạch Mai, Chợ Rẫy và Nhi đồng 1 Tp HCM. Tương tự như vậy Chùm XVI có độ tương đồng 92% và cũng có đến 4/5 chủng phân lập được tại bệnh viện TƯ Huế.

3.2. Tương đồng kiểu gen với kháng carbapenem

Trong 73 chủng *A.baumannii*, có 20 chủng kháng carbapenem, phân tích bằng PFGE cho thấy có 3 chùm vi khuẩn khác nhau (Hình 3.2) trong đó: chùm (A) gồm có 11 chủng có kiểu gen tương đồng đến 96%, có 6/11 chủng *A. baumannii* từ Bệnh viện TƯ Huế. Chùm B gồm có 4 chủng có kiểu gen tương đồng 90,5%, trong đó 2 từ Bệnh viện TƯ Huế; 1 từ BV Trung Vương và 1 từ Bệnh viện Nhi Đồng 1. Chùm C gồm có 5 chủng, có 4 từ Bệnh viện TƯ Huế.



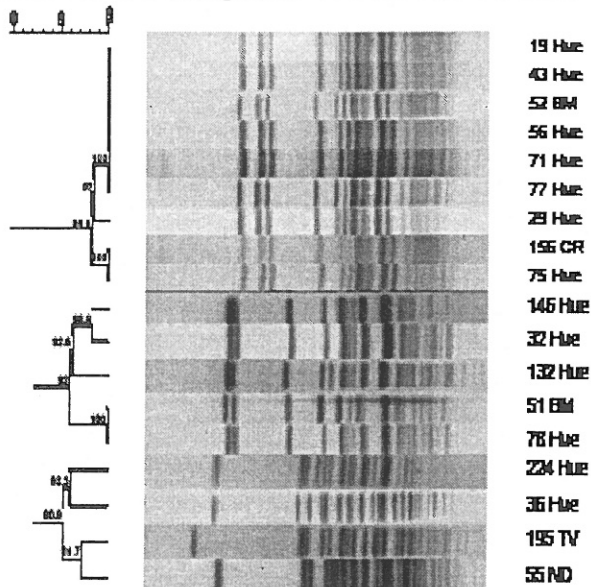
Hình 3.2: Phân bố các chùm có kiểu gen kháng với carbapenem

3.3. Tương đồng kiểu gen các chủng *A. baumannii* tại khoa Hồi sức

18 chủng *A.baumannii* phân lập được từ các khoa HSTC của 6 bệnh viện chia làm 3 chùm khác

Bệnh viện Trung ương Huế

nhau (Hình 3.3) bằng kỹ thuật PFGE trong đó chùm D có mối tương đồng kiểu gen tới 96,5% và có 7 chủng phân lập được tại khoa Hồi sức tích cực của Bệnh viện TƯ Huế, chùm E có 5 chủng kiểu gen tương đồng đến 92% và 4 chủng thuộc bệnh viện TƯ Huế, chùm F có 4 chủng kiểu gen tương đồng đến 91% và 3 chủng thuộc về Bệnh viện TƯ Huế.



Hình 3.3: Phân bố chùm *A.baumannii* tại khoa Hồi sức tích cực

IV. BÀN LUẬN

Áp dụng kỹ thuật PFGE phân tích 73 chủng *A. baumannii* phân lập từ 6 bệnh viện đã cho thấy có 16 chùm (cluster) được ký hiệu từ I đến XVI với mức độ tương đồng về kiểu gen của các chủng *A. baumannii* từ 89,5 % tới 100 %. Đặc biệt chùm IV, gồm có 13 chủng *A. baumannii* có độ tương đồng tới 96,4% phân lập được ở 4 bệnh viện cả 3 miền Bắc (1BM), Trung (8 từ TWH) và Nam (2 từ BVCR và 2 từ BVND), điều này cho thấy có sự lưu hành của các chủng có cùng kiểu gen tương đồng cao ở nhiều bệnh viện khác nhau. Phải chăng các chủng *A. baumannii* này có cùng nguồn gốc và được phát tán từ bệnh viện này sang các bệnh viện khác hoặc ngược lại. Vấn đề này tiếp tục đặt lên vai các nhà kiểm soát nhiễm khuẩn và vi sinh, cần phải làm gì tiếp theo để có thể biết rõ con đường lưu hành của các chủng này cũng như xác định rõ nguồn lây

nhiễm, đường lây nhiễm để kịp thời ngăn chặn sự tiếp tục phát tán của các chủng này. PFGE là một phương pháp hữu hiệu tiếp cận dịch tễ học phân tử mà nhiều quốc gia trên thế giới đã áp dụng để phát hiện nguồn nhiễm và khả năng lây lan của các chủng này ở trong cùng một khoa hay nhiều khoa phòng, bệnh viện, vùng, quốc gia trên thế giới.

Trong nghiên cứu này 20 chủng *A. baumannii* kháng với nhóm carbapenem phân lập được tạo ra 3 chùm vi khuẩn khác nhau (A,B,C) có tương đồng kiểu gen trên 90% nằm rải rác ở cả 6 bệnh viện, đặc biệt chùm A với 11 chủng *A. baumannii* kháng với carbapenem có kiểu gen tương đồng đến 96%, trong đó có 5/11 chủng từ Bệnh viện TƯ Huế, chùm C gồm 5 chủng với kiểu gen tương đồng đến 92%, trong đó có đến 4 chủng *A. baumannii* là từ Bệnh viện TƯ Huế. Theo những nghiên cứu về dịch tễ học phân tử, nhiều tác giả đã chứng minh *A. baumannii* kháng với kháng sinh nhóm carbapenem có thể kháng với nhiều kháng khác nhau trong nhóm β -lactam và chúng có thể phát tán sự lây lan qua con đường plasmid và/hoặc nhiễm sắc thể. Điều đó giúp giải thích tại sao ở Bệnh viện TƯ Huế tồn tại dai dẳng các chủng *A. baumannii* có kiểu gen tương đồng cao. Đây rất có thể là nguy cơ tiềm tàng phát tán các chủng vi khuẩn kháng thuốc ra nhiều các khoa phòng hoặc bệnh viện khác. Nghiên cứu của Pilar và CS (2010), tại Tây Ban Nha đã cho thấy có sự tái lập của những chủng có tương đồng về kiểu gen tại các bệnh viện trong những năm khác nhau và sự lưu hành xảy ra khi những nguồn nhiễm không được kiểm soát [6]. Tương tự, A.Nemec và cs, khi phân tích 150 chủng phân lập từ 56 khoa Hồi sức tích cực, thuộc 20 bệnh viện và 15 thành phố khác nhau của nước Cộng hòa Czech, đã phát hiện có 108 chủng *A. baumannii* có kiểu gen tương đồng với kiểu gen EU Clone I, và 16 chủng có kiểu gen tương đồng với EU Clone II [5].

Trong nghiên cứu này, phát hiện 18 chủng *A. baumannii* phân lập được từ các khoa Hồi sức tích cực của 6 bệnh viện với 3 kiểu gen khác nhau qua 3 chùm D, E, F, trong đó đáng chú ý là chùm D có 9 chủng *A. baumannii* có kiểu gen tương đồng đến gần 97%, 6 chủng tương đồng đến 100%, 5 trong số 6 chủng đó là của khoa Hồi sức Bệnh viện TƯ

Huế. Tương tự ở cụm E có kiểu gen tương đồng đến 92%, trong đó có đến 4 chủng thuộc Bệnh viện TƯ Huế. Nghiên cứu của Trương Thị Anh Thư và CS (2012), thực hiện trên những bệnh nhân viêm phổi do *A. baumannii* thực hiện tại khoa Hồi sức tích cực Bệnh viện Bạch Mai đã cho thấy có sự tương đồng về kiểu gen trên 80% của các chủng *A. baumannii* trong dịch phế quản tồn tại trong suốt 8 tháng nghiên cứu [1].

V. KẾT LUẬN

Các chủng *A. baumannii* phân lập được tại các bệnh viện lớn của Việt Nam có mối tương đồng cao về kiểu gen. Có mối liên quan kiểu gen giữa các chủng phân lập được tại khoa Hồi sức tích cực và gen kháng kháng sinh của chúng. PFGE là kỹ thuật sinh học phân tử giúp ích cho các nhà lâm sàng trong xác định yếu tố dịch tễ học của các chủng vi khuẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trương Thị Anh Thư (2012) Đặc điểm dịch tễ học nhiễm khuẩn phổi bệnh viện tại khoa Hồi sức tích cực Bệnh viện Bạch Mai 2008-2009, *Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương*, <http://www.nihe.org.vn>, Truy cập ngày 16 tháng 2 năm 2013.
2. Nguyễn Vũ Trung (2009) *Acinetobacter*, *Vi khuẩn học*, Nhà xuất bản giáo dục, Đại học Y khoa Hà Nội, tr.319.
3. Callie Camp, Owatha L. Tatum (2010) "A Review of *Acinetobacter baumannii* as a Highly Successful Pathogen in Times of War". *Labmedicine*, 41 (11), pp.650-657.
4. Villalon P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, et al (2011) "Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain". *Journal of clinical microbiology*, 49 (3), pp.875 -882.
5. Alexandr Nemec, Lenka Križova', Martina Maixnerova, et al (2009) "Emergence of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* in the Czech Republic is associated with the spread of multidrug-resistant strains of European clone II". *J Antimicrob Chemother*, 62, pp.484-489.
6. Pilar V, et al (2011) "Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain". *Journal of clinical microbiology*, 49 (3), pp.875 -882.