



**HỘI NGHỊ KHOA HỌC & KỸ THUẬT
NGÀNH Y TẾ ĐỒNG NAI
Lần thứ VII – Năm 2019**



**TÁM GEN MỚI ĐƯỢC PHÁT HIỆN
Ở CHỦNG *Acinetobacter baumannii* GÂY
NHIỄM TRÙNG HÔ HẤP TẠI BỆNH VIỆN
ĐA KHOA THỐNG NHẤT ĐỒNG NAI**

BCV: ThS. Nguyễn Sĩ Tuấn

Trưởng khoa Vi sinh – Bệnh viện Đa khoa Thống Nhất – Đồng Nai

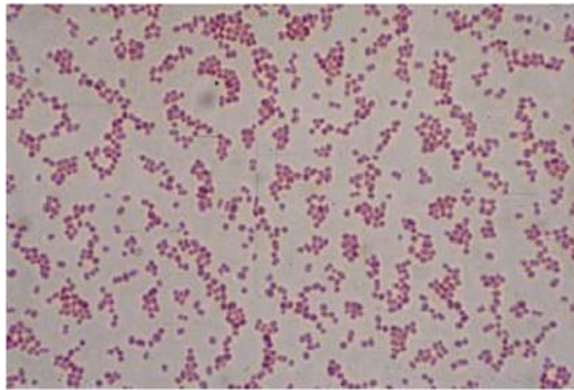
Hội Vi sinh Lâm sàng Thành phố Hồ Chí Minh

Đồng Nai, tháng 5 năm 2019

NỘI DUNG



1. Tổng quan



A



B

(A): Minh họa tiêu bản nhuộm Gram cầu – trực khuẩn Gram âm; (B): Đặc trưng của *Acinetobacter baumannii* trên thạch MacConkey có màu hồng nhạt.

D. L. C. Gary W. Procop, Geraldine S. Hall, William M. Janda, Elmer W. Koneman, Paul C. Schreckenberger, Gail L. Woods, Koneman's Color Atlats and Textbook of Diagnostic Microbiology, 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2017.

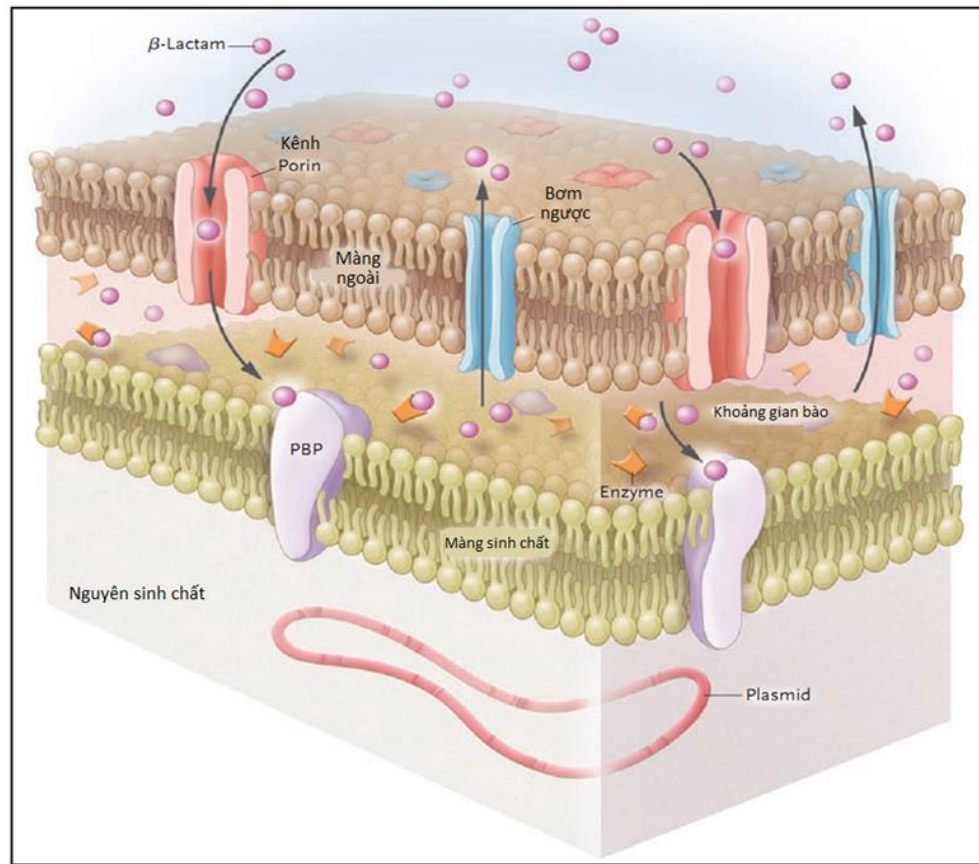
1. Tổng quan

Các điểm đặc trưng của giống *Acinetobacter*

Test	<i>A. baumannii</i>	<i>A. Iwoffii</i>
Oxidase	-	-
Di động	-	-
Phát triển trên thạch MacConkey	+	+
Phát triển ở 42°C	+	-
OF glucose	+	-
Khử NO ₃	-	-
Gelatin	V	V
Urea	V	V
Sinh sắc tố	-	-
+: ≥ 90% các chủng dương tính; -: ≥ 90% các chủng âm tính; V: 11% - 89% các chủng dương tính		

D. L. C. Gary W. Procop, Geraldine S. Hall, William M. Janda, Elmer W. Koneman, Paul C. Schreckenberger, Gail L. Woods, Koneman's Color Atlats and Textbook of Diagnostic Microbiology, 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2017.

1. Tổng quan



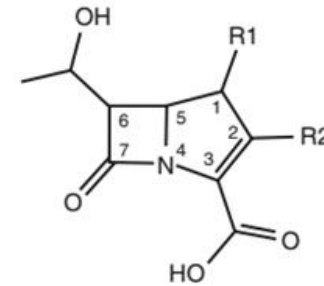
Các cơ chế đề kháng kháng sinh chủ yếu ở *Acinetobacter*

L. S. Munoz-Price and R. A. Weinstein, "Acinetobacter infection," *New England Journal of Medicine*, vol. 358, pp. 1271-1281, 2008.

1. Tổng quan

KHÁNG SINH CARBAPENEM

- Monobactam: aztreonam
- Carbapenems:
 - Imipenem
 - Meropenem
 - Ertapenem
 - Doripenem



	<u>R1</u>	<u>R2</u>
Thienamycin	H	
Imipenem	H	
Meropenem	CH ₃	
Ertapenem	CH ₃	
Doripenem	CH ₃	

B. R. Masters, "Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, (2015) Eds: John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser. ISBN: 13-978-1-4557-4801-3, Elsevier Saunders," ed: Springer, 2016.

1. Tổng quan

CARBAPENEM – “THE BIG GUN”

- Ertapenem
- Imipenem
- Meropenem
- Doripenem



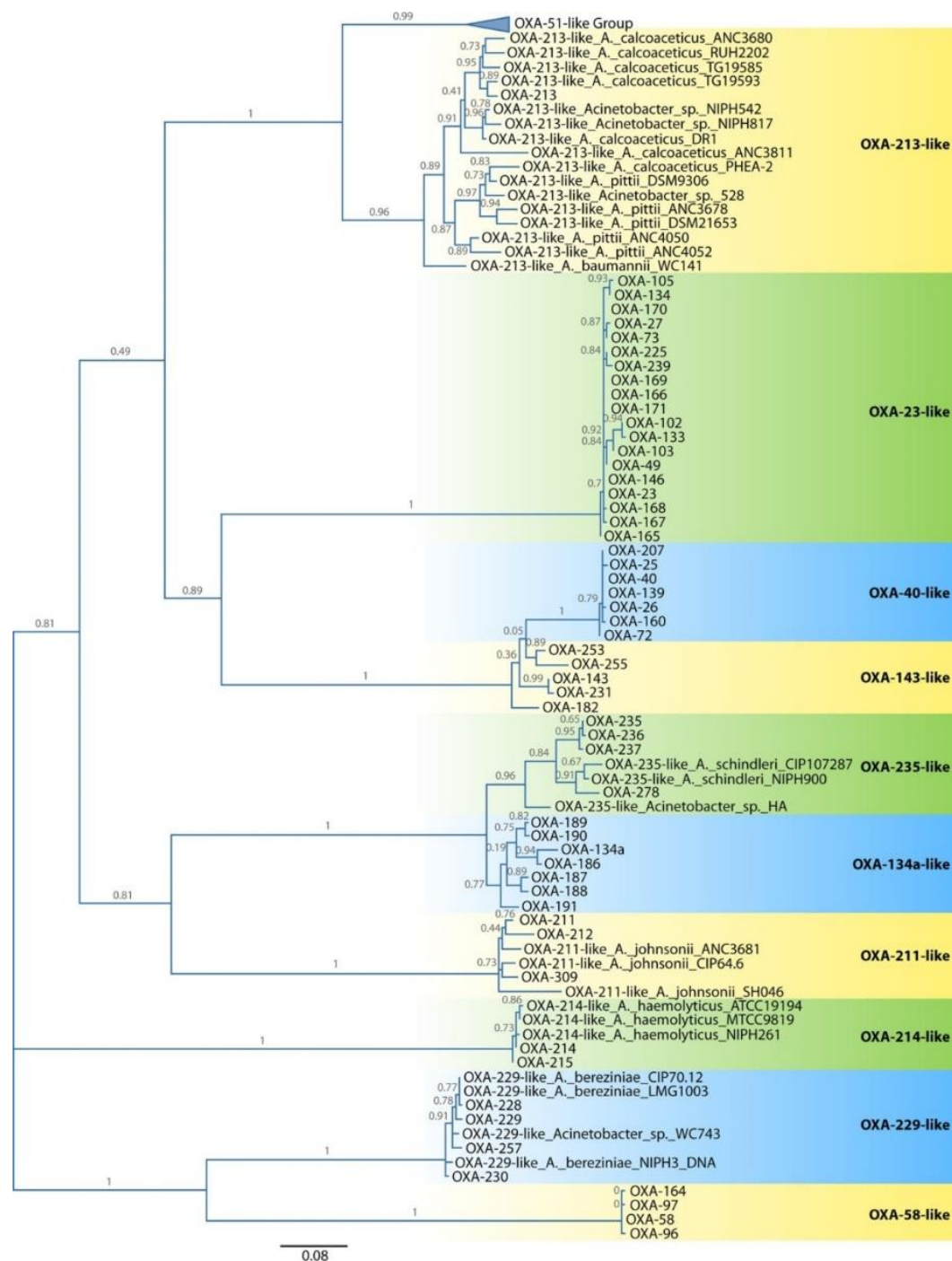
Walsh, T. R. (2010). Emerging carbapenemases: a global perspective. International journal of antimicrobial agents, 36, S8-S14.

1. Tổng quan

Nhóm β -lactamase thủy phân β -lactam, Marsik và Nambiar, 12/2011				
Nhóm Ambler	Nhóm Bush-Jacoby	Tên chung	Kháng trung gian với	Các ví dụ
A	2f	Serine carbapenemase	Carbapenem, penicillin, cephalosporin, aztreonam	KPC, GES, SME
B	3a	Metallo-carbapenemase	Tất cả β -lactam, ngoại trừ aztreonam	IMP, NDM, VIM, IND
C	1	Serine cephalosporinase	Penicillin, cephalosporin, gồm cefoxitin, cefotetan, ceftriaxone, cefotaxime	AmpC
D	2df	Carbapenemase	Carbapenem, penicillin, cephalosporin, aztreonam	OXA

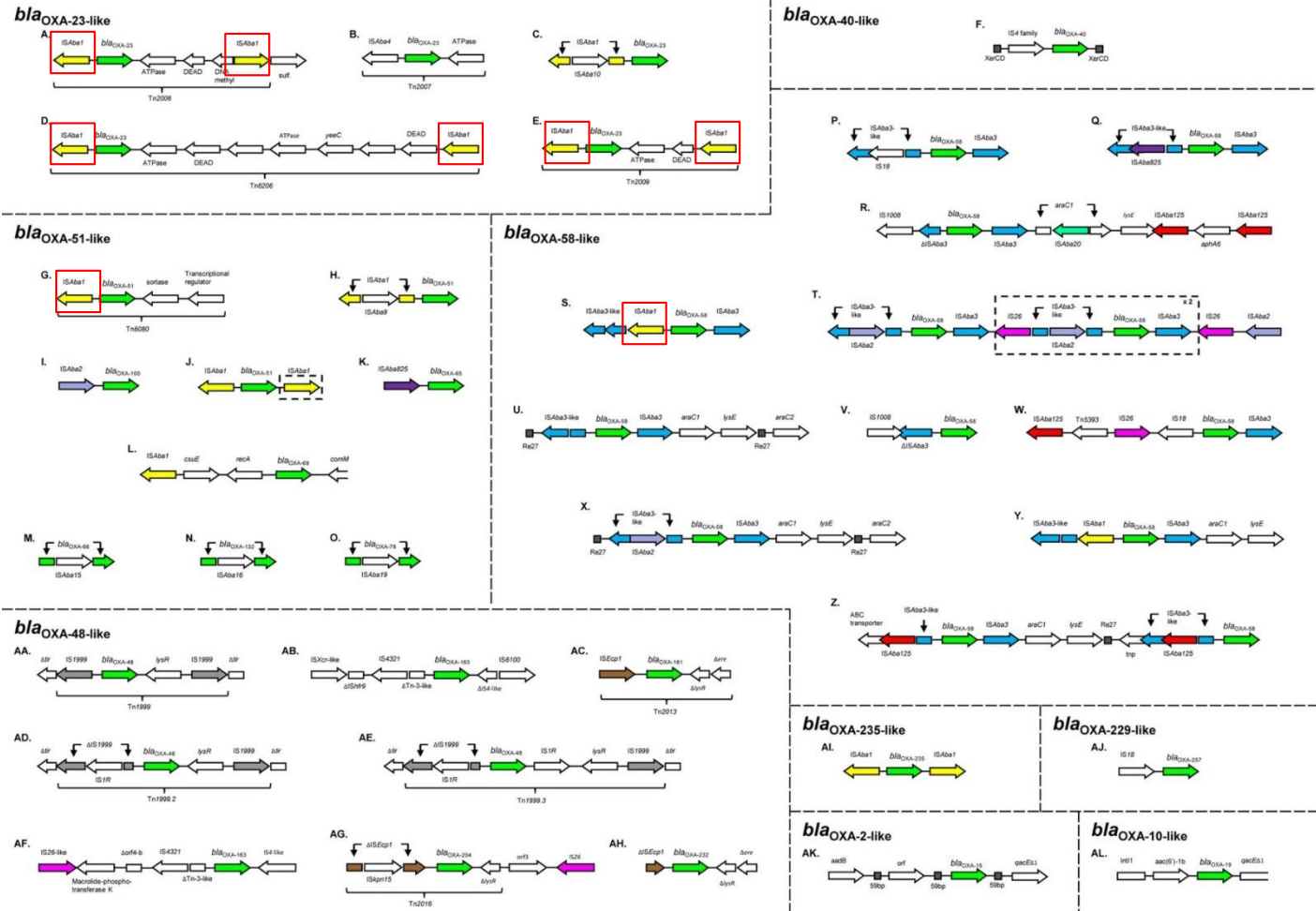
Marsik, F. J., & Nambiar, S. (2011). Review of carbapenemases and AmpC-beta lactamases. *The Pediatric infectious disease journal*, 30(12), 1094-1095.

1. Tổng quan



B. A. Evans and S. G. Amyes,
"OXA β -lactamases," *Clinical microbiology reviews*, vol. 27,
pp. 241-263, 2014.

1. Tổng quan

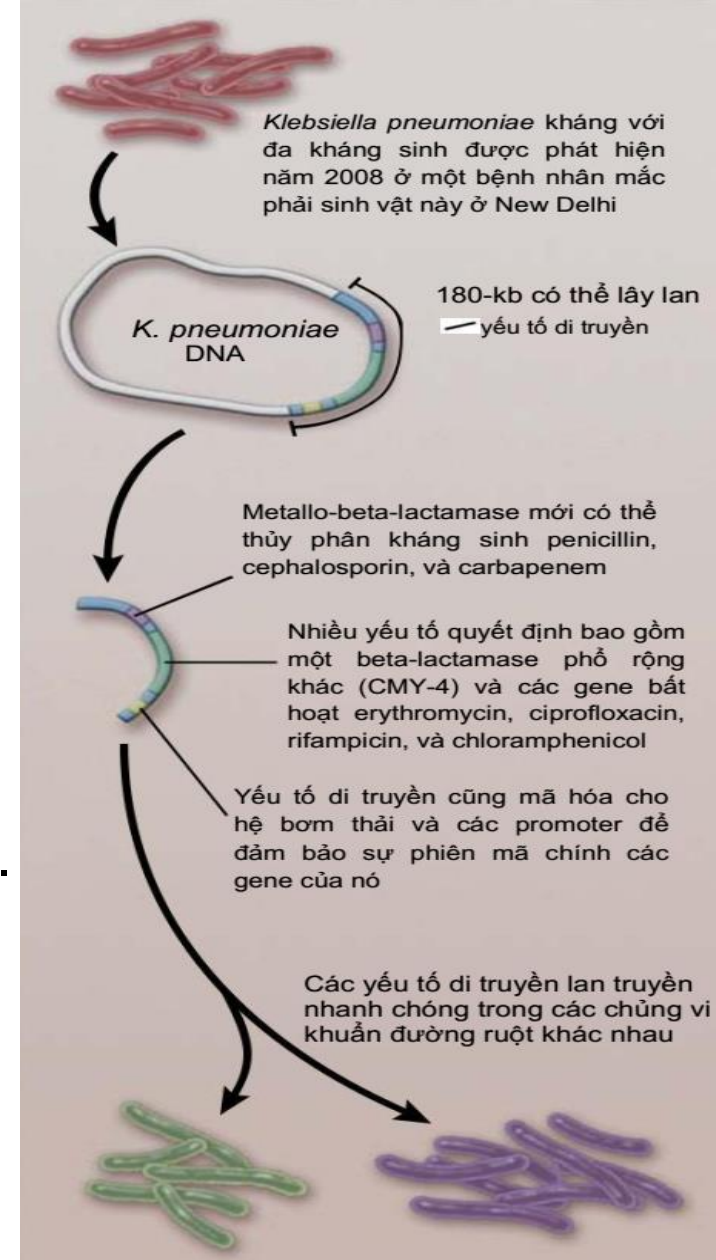


B. A. Evans and S. G. Amyes, "OXA β -lactamases," Clinical microbiology reviews, vol. 27, pp. 241-263, 2014.

1. Tổng quan

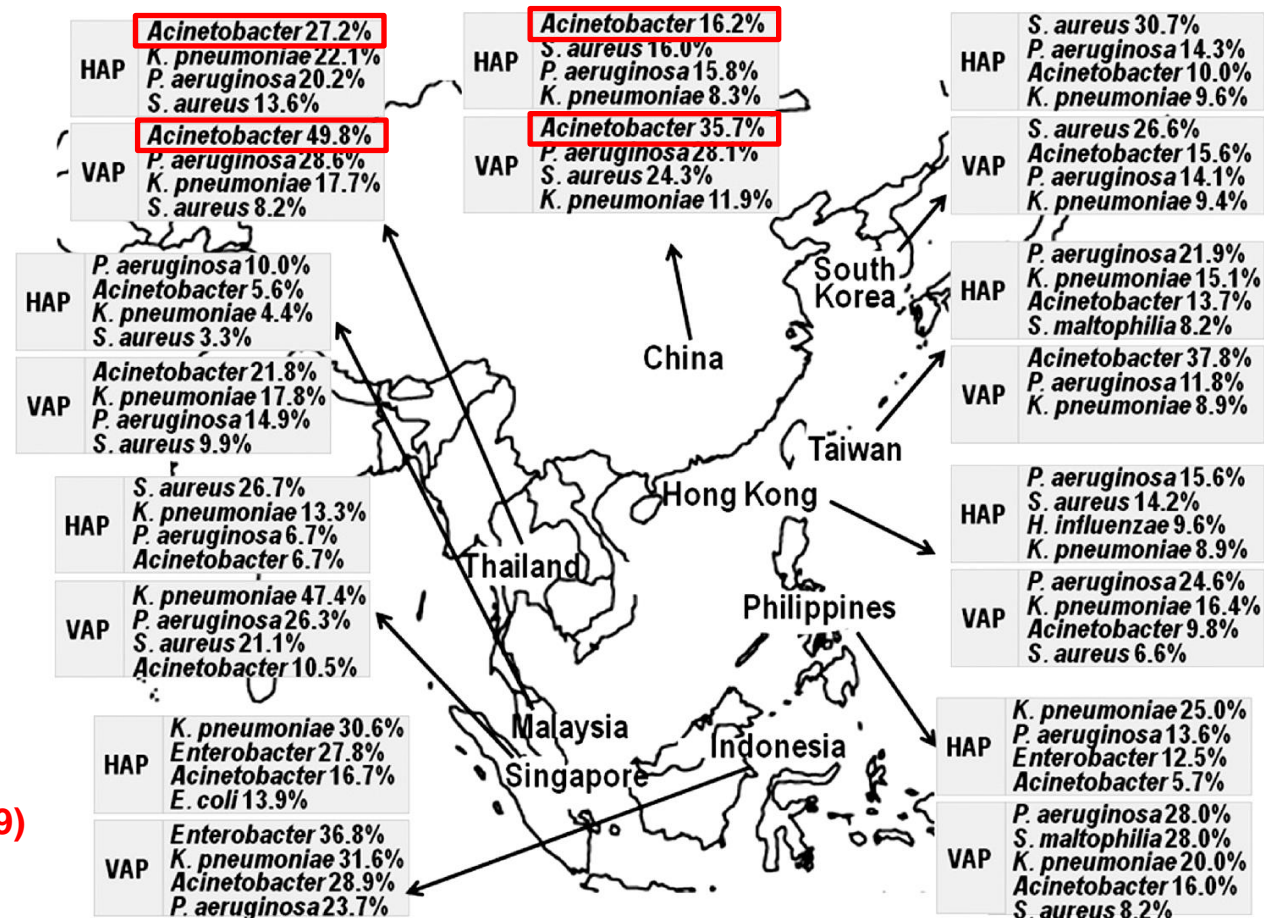
Có 7 biến thể NDM tồn tại (NDM-1 tới NDM-7).

Cho tới nay, NDM-1 vẫn là biến thể NDM phổ biến nhất đã phân lập được.



<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMp1011715#t=article>

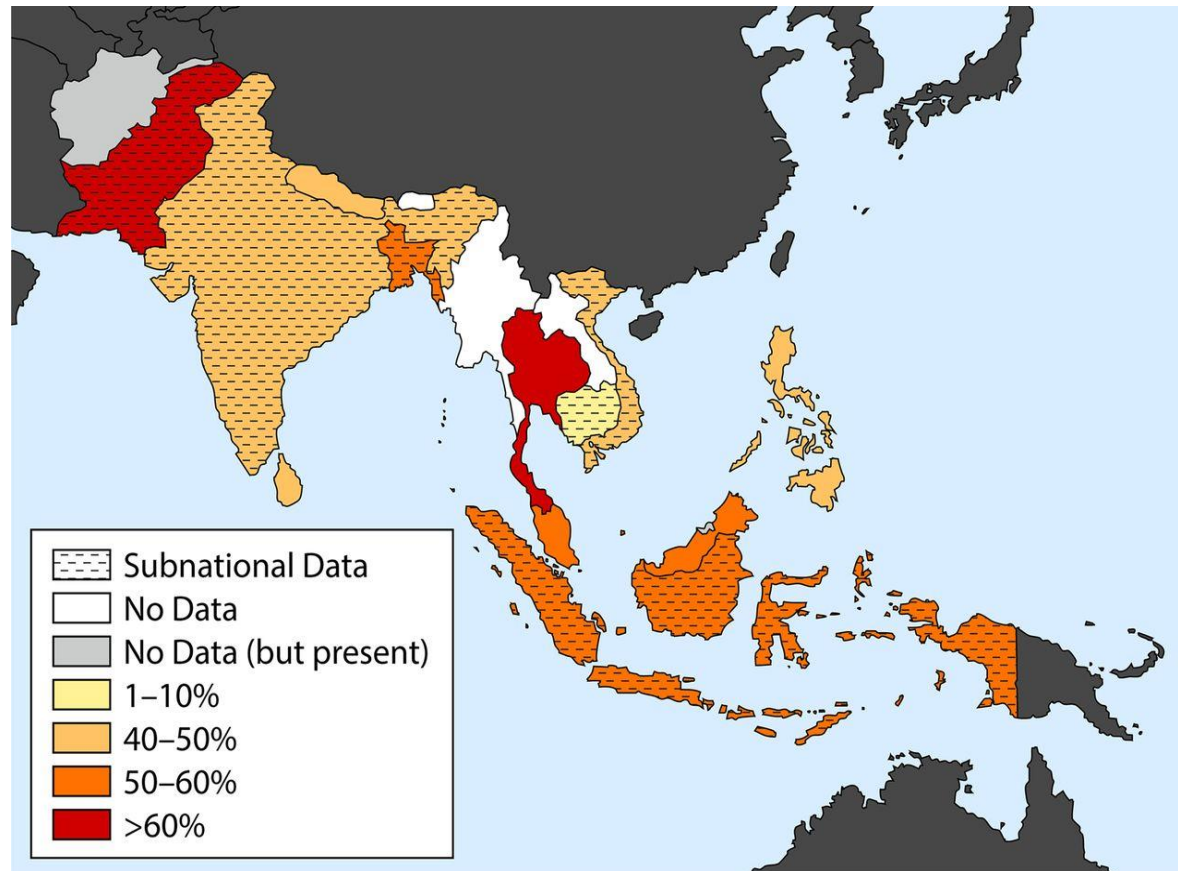
1. Đặt vấn đề



So sánh tỷ lệ các
vi khuẩn phổ biến
phân lập từ bệnh
viện tại 10 nước
Châu Á (2008 – 2009)

D. R. Chung, J.-H. Song, S. H. Kim, V. Thamlikitkul, S.-G. Huang, H. Wang, et al., "High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia," American journal of respiratory and critical care medicine, vol. 184, pp. 1409-1417, 2011.

1. Đặt vấn đề



Tỷ lệ ước tính *Acinetobacter baumannii* đề kháng carbapenem ở các quốc gia Nam và Đông Nam Á

L.-Y. Hsu, A. Apisarnthanarak, E. Khan, N. Suwantararat, A. Ghafur, and P. A. Tambyah, "Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Enterobacteriaceae* in south and southeast Asia," *Clinical microbiology reviews*, vol. 30, pp. 1-22, 2017.

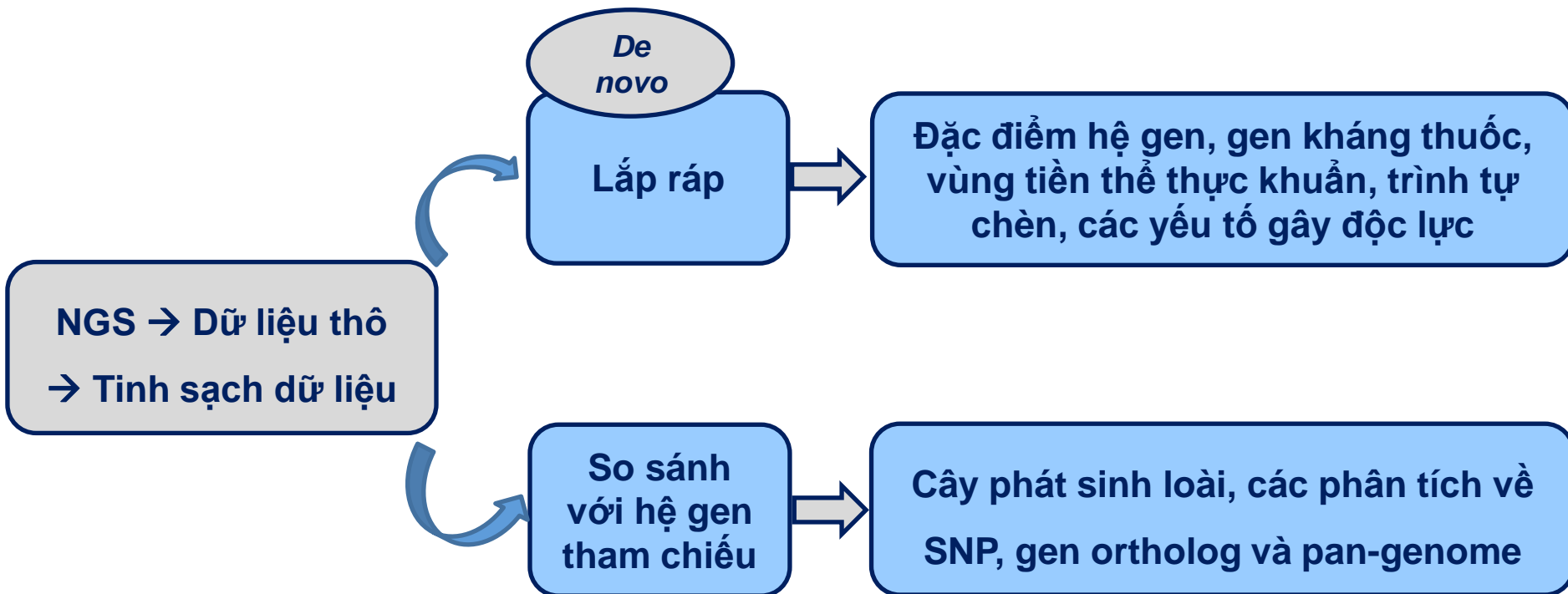
2. Mục tiêu tổng quát

- ❖ Phân tích đặc điểm hệ gen *in-silico* của các chủng *Acinetobacter baumannii* đặc trưng tính kháng carbapenem.

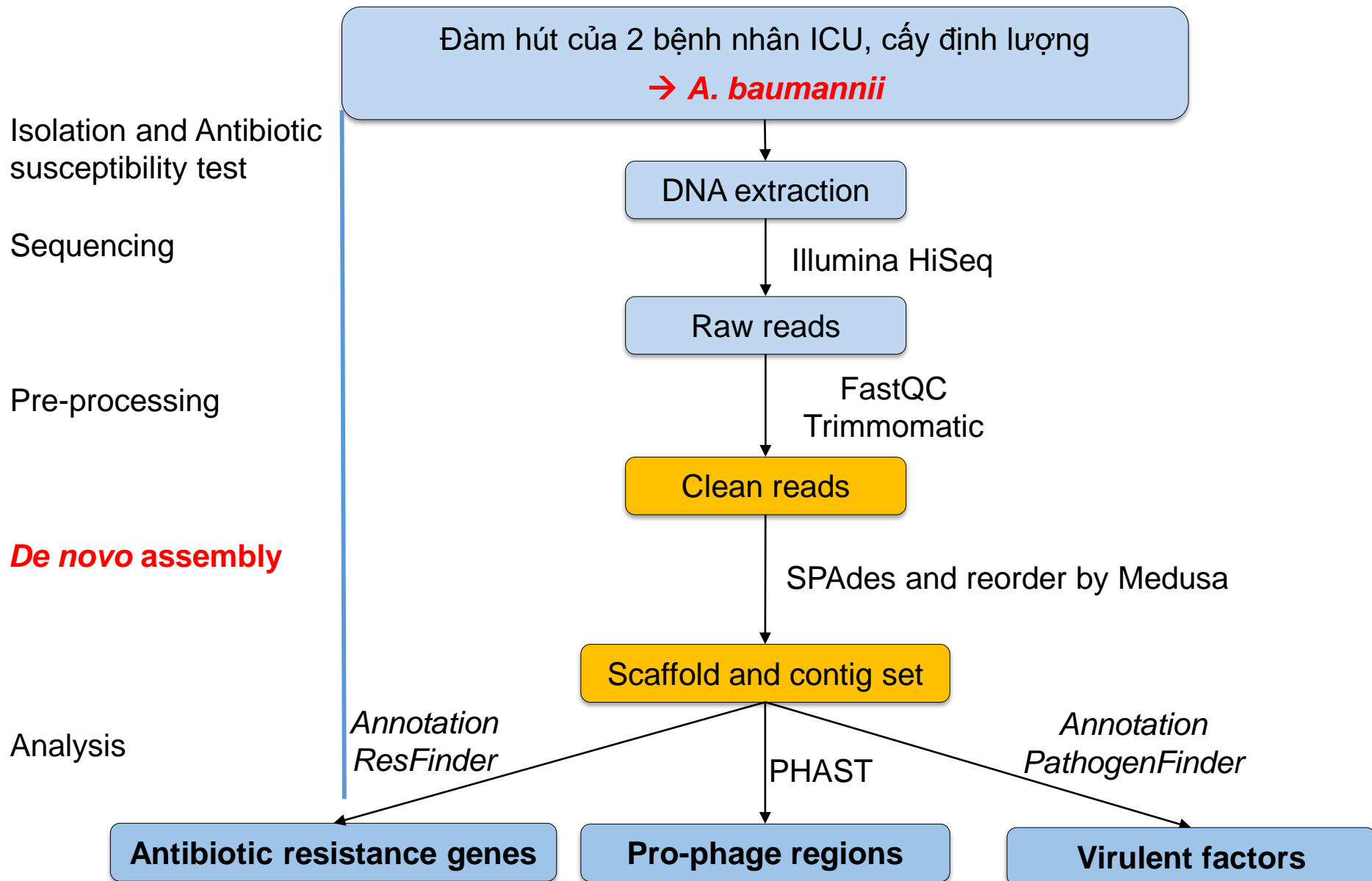
2.1 Mục tiêu chi tiết

- ❖ Xác định đặc điểm hệ gen các chủng *Acinetobacter baumannii* đặc trưng tính kháng carbapenem.
- ❖ Xác định gen gây độc lực, gen đề kháng kháng sinh *in-silico*, các trình tự chèn của các chủng *A. baumannii* đặc trưng.
- ❖ Xác định nguồn gốc và sự đa hình của các chủng *A. baumannii* đặc trưng.

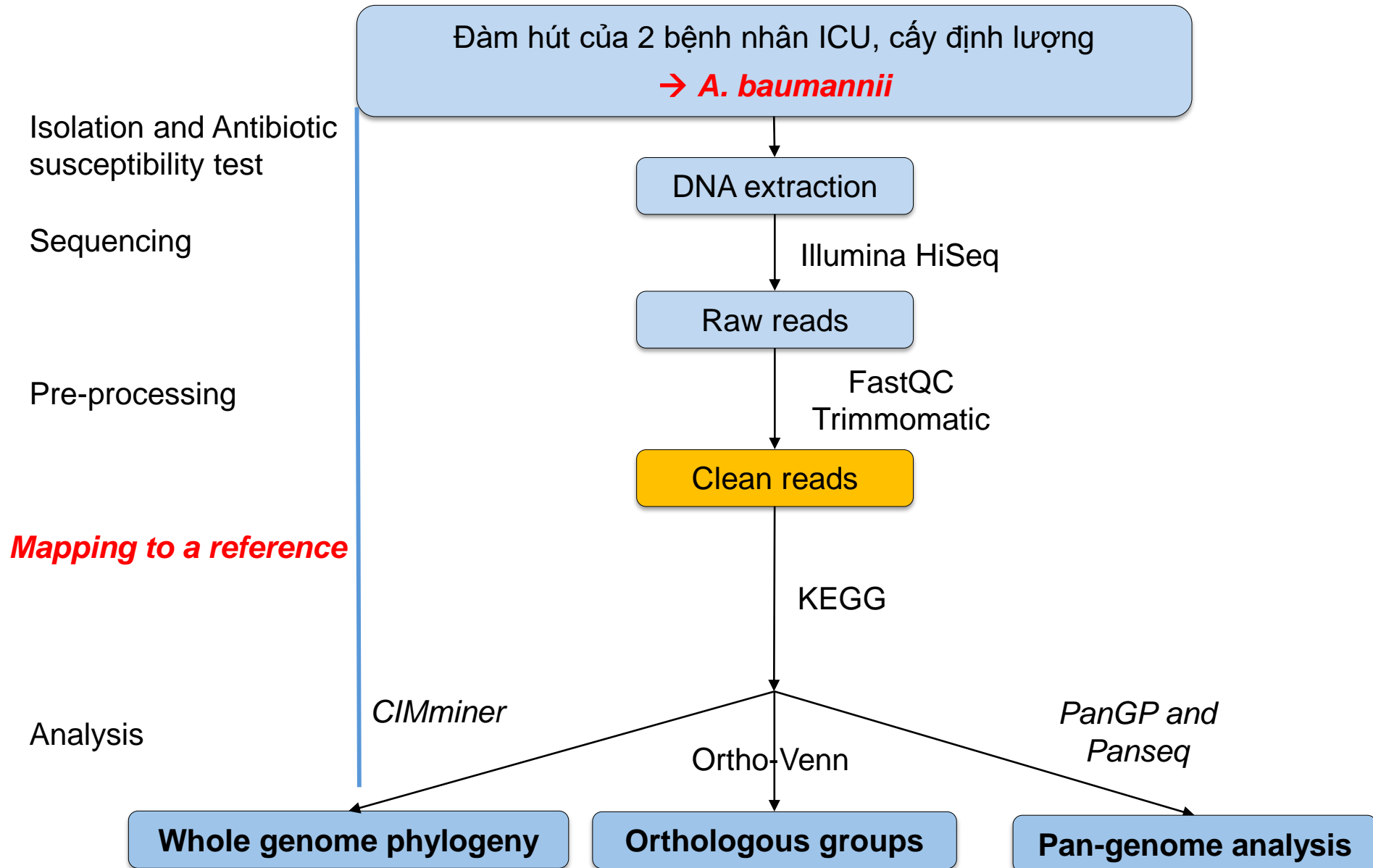
2.2. Sơ đồ mục tiêu chi tiết



3. Vật liệu và phương pháp



3. Vật liệu và phương pháp



3. Vật liệu và phương pháp

Isolation and Antibiotic
susceptibility test

Sequencing

Pre-processing

Mapping to a reference

Analysis

Đàm hút của 2 bệnh nhân ICU, cấy định lượng

→ *A. baumannii*

DNA extraction

Illumina HiSeq

Raw reads

FastQC
Trimmomatic

Clean reads

KEGG

HISAT2

Samtools

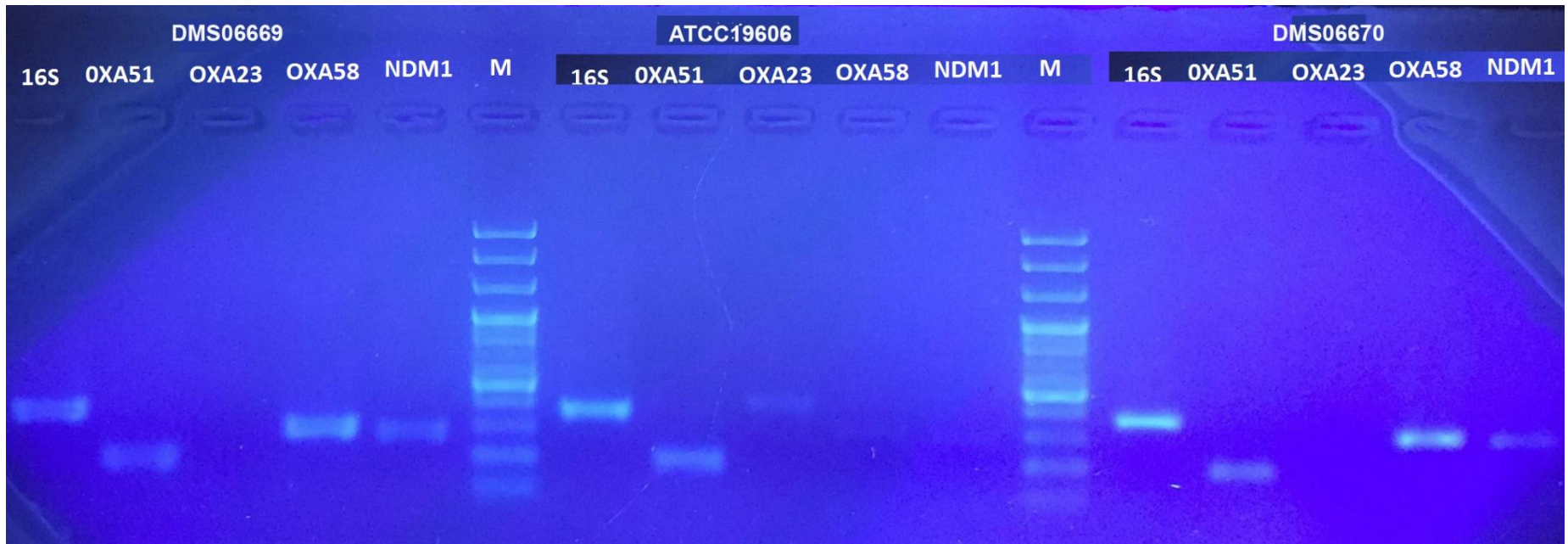
softwares

VarScan

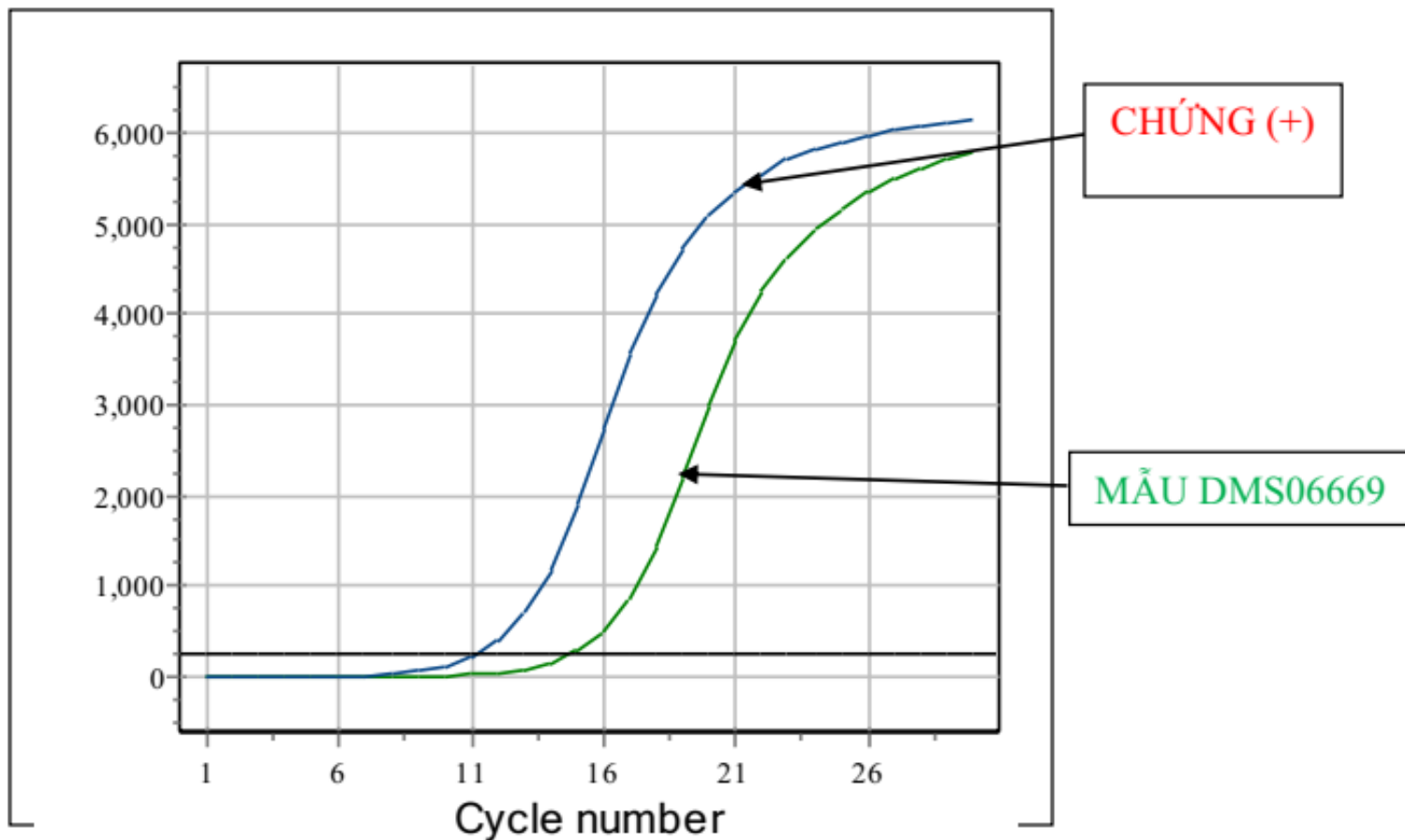
SNPs on antibiotic resistance genes

4. Kết quả và thảo luận

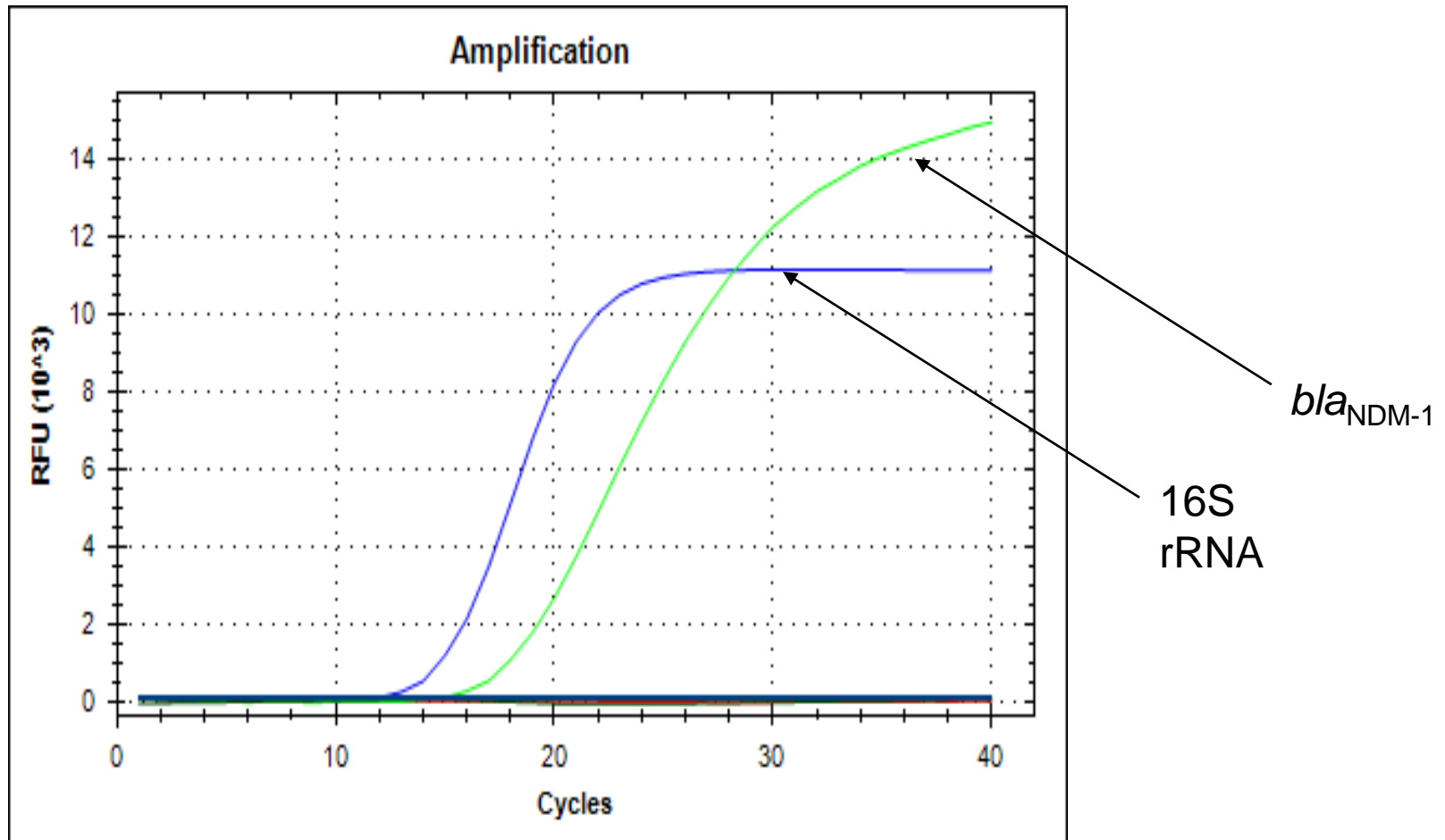
Đặc điểm gene mã hóa carbapenemase 2 chủng đặc trưng



Đặc điểm gene mã hóa IS*Aba1*

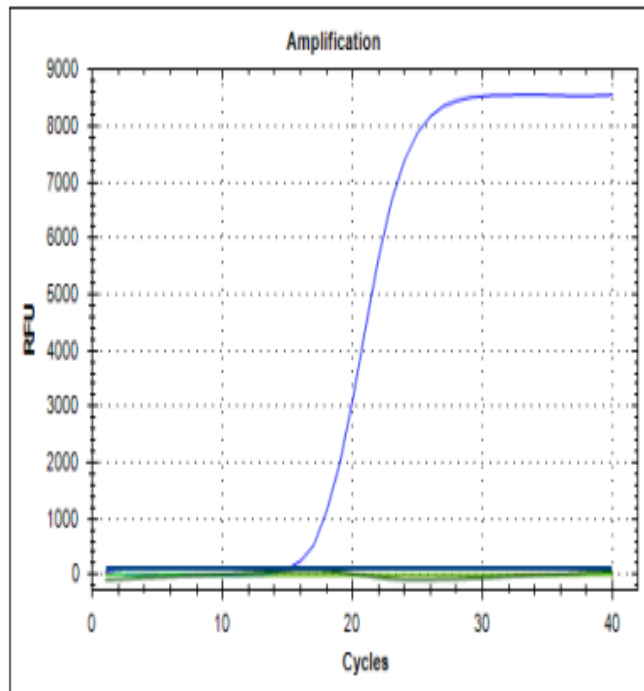


Realtime PCR phát hiện gene mã hóa NDM-1

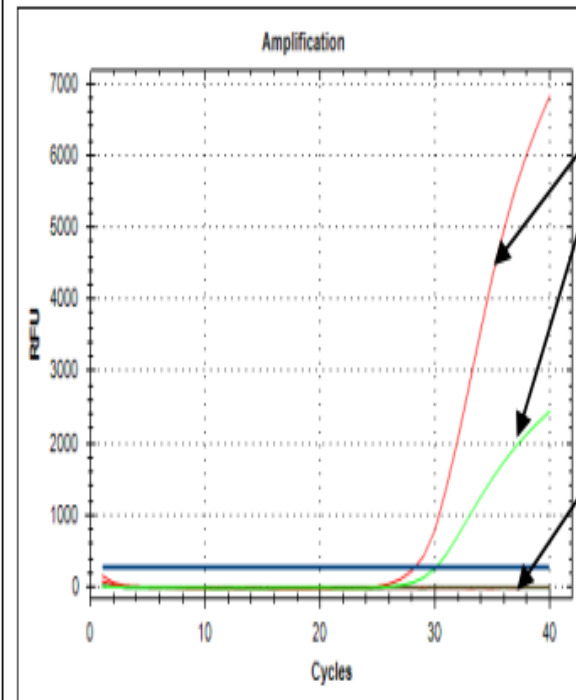


Realtime PCR phát hiện gene mã hóa NDM-1

MẪU ÂM



CHỨNG DƯƠNG VÀ ÂM



Chứng dương
KPC/NDM1

CHỨNG ÂM

Thử nghiệm nhạy cảm kh

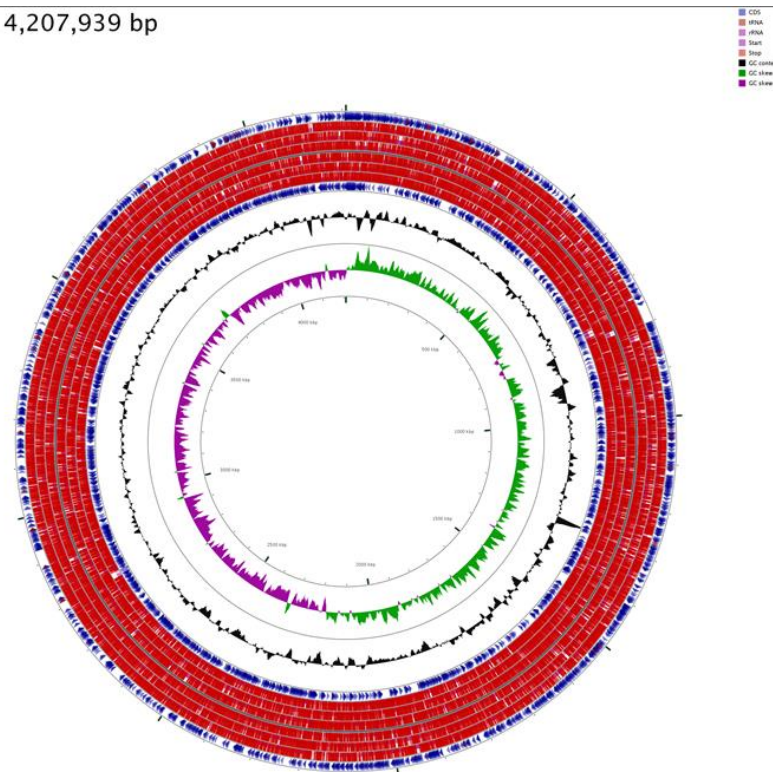
Antibiotic name	MIC on DMS0669 plate (µg/ml)	MIC on DMS06670 plate (µg/ml)
Colistin	≤1	≤1
Tigecycline	≤1	2
Ciprofloxacin	>2	>2
Levofloxacin	4	>4
Ceftriaxone	>4	>4
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>4/76	>4/76
Imipenem	>8	>8
Meropenem	>8	>8
Gentamicin	>8	>8
Cefazolin	>8	>8
Ampicillin/Sulbactam	>16/8	>16/8
Ceftazidime	>16	>16
Cefepime	>16	>16
Cefoxitin	>16	>16
Aztreonam	>16	>16
Amikacin	>32	≤8
Cefoperazone/Sulbactam	>32/8	>32/8
Piperacillin/Tazobactam	>64/4	>64/4
Ticarcillin/Clavulanic acid	>128/2	>128/2

The
susceptibility
profile of two
A. baumannii
strains

Lắp ráp *De novo*, dự đoán gen, chú giải chức năng

Đặc điểm	Thống kê
Pair-end raw reads	4,750,865
Pair-end clean reads (Remaining percentage)	100.00%
Length of total draft genome length (bp)	4,369,281
Number of scaffolds	24
Length of scaffold (N50)	4,207,939
GC content (%)	38.91
No. coding sequences	4,101
No. tRNAs	63
No. rRNAs	3
No. of CRISPR	2 (1 confirmed; 1 questionable)
No. of tandem repeat sequences	6
No. of insertion sequences	62

Length: 4,207,939 bp

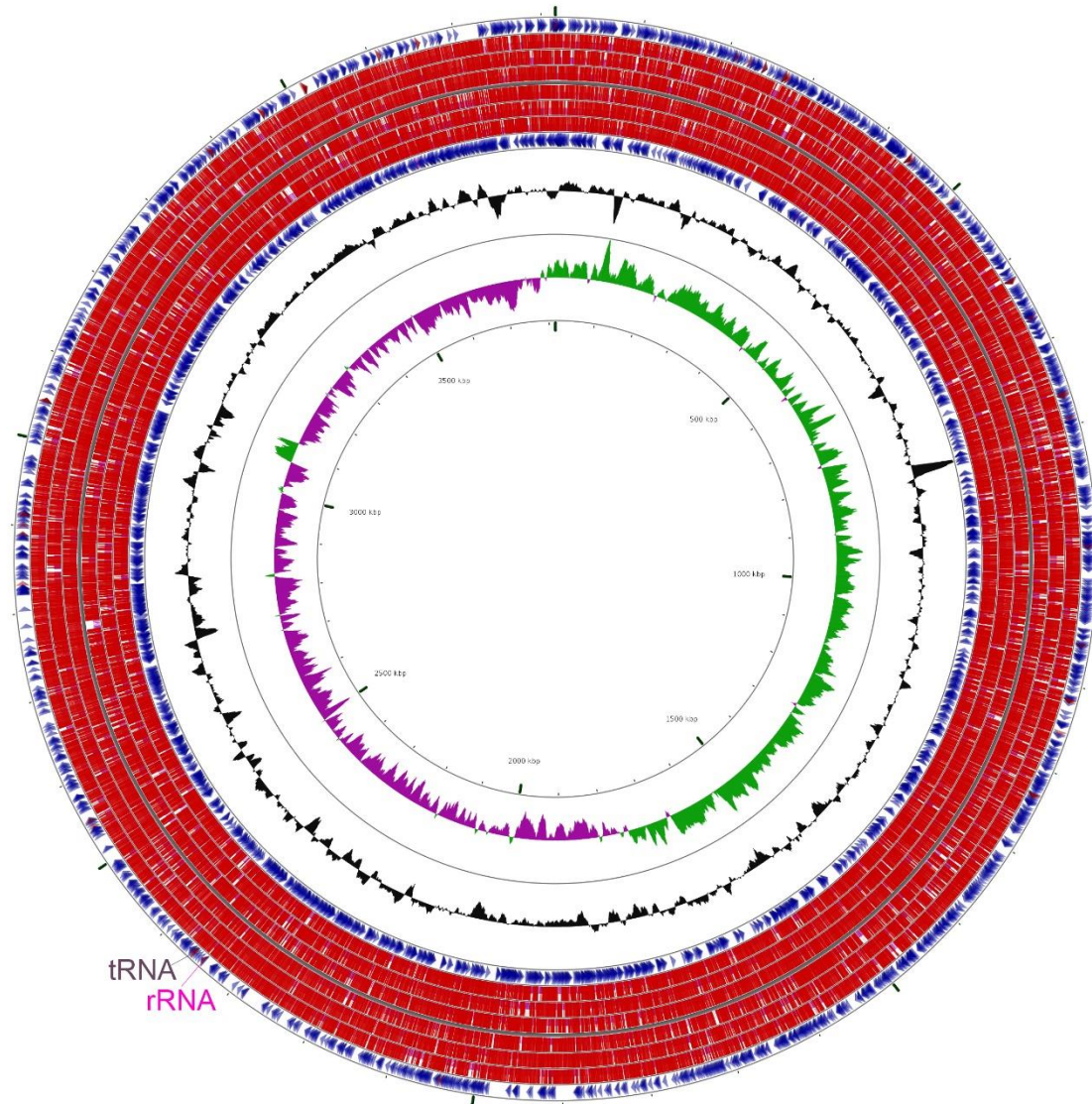


Acinetobacter baumannii DMS06669

Length: 3,815,999 bp

- CDS
- tRNA
- rRNA
- Start
- Stop
- GC content
- GC skew+
- GC skew-

- CDS
- tRNA
- rRNA
- Start
- Stop
- GC content
- GC skew+
- GC skew-



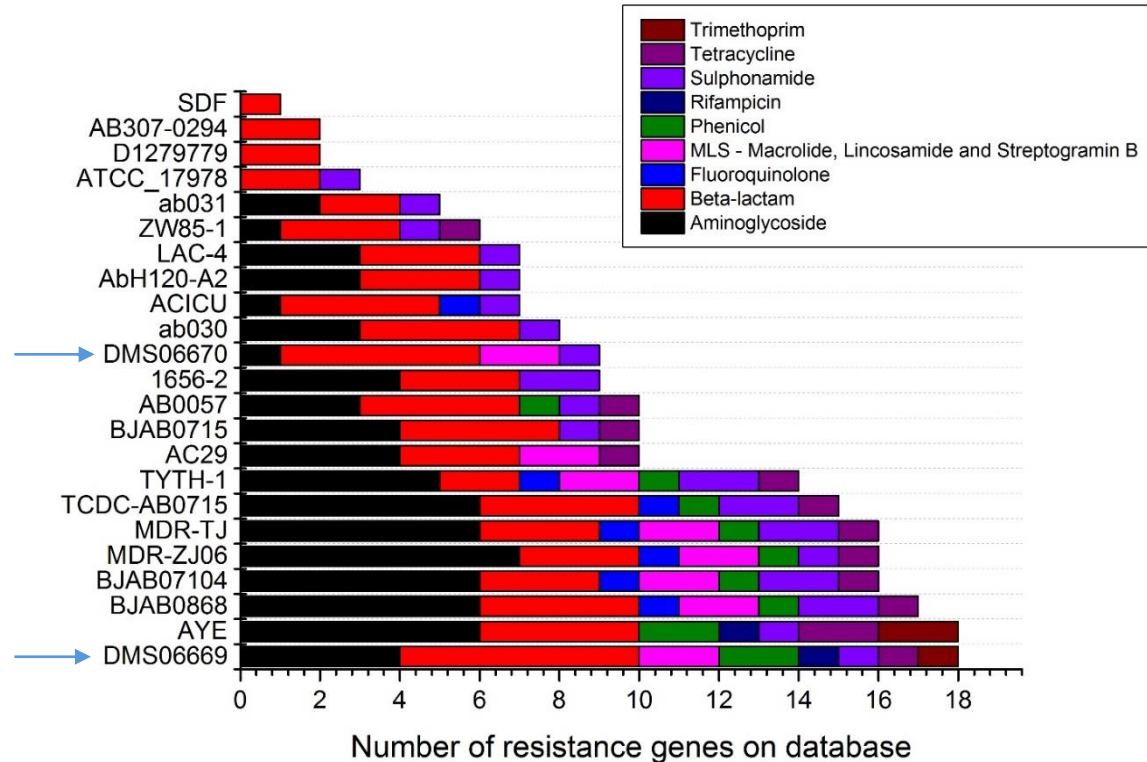
Acinetobacter baumannii DMS06670

Bảng 3. 31. Ô gene đề kháng kháng sinh ở *A. baumannii* DMS06669, DMS06670

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>rmtB</i>	Aminoglycoside	100	756 / 756
DMS06669_scf_2_2	<i>bla_{VEB-7}</i>	Beta-lactam	99,89	900 / 900
DMS06669_scf_23_2	<i>bla_{OXA-10}</i>	Beta-lactam	100	801 / 801
DMS06669_scf_18_1	<i>bla_{OXA-58}</i>	Beta-lactam	100	843 / 843
DMS06669_scf_1_2828	<i>bla_{ADC-25}</i>	Beta-lactam	96,35	1152 / 1152
DMS06669_scf_11_9	<i>bla_{NDM-1}</i>	Beta-lactam	100	813 / 813
DMS06669_scf_1_1731	<i>bla_{OXA-64}</i>	Beta-lactam	100	825 / 825
DMS06669_scf_23_1	<i>cmlA1</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	<i>ARR-3</i>	Rifampicin	100	453 / 453
DMS06669_scf_4_2	<i>dfra27</i>	Trimethoprim	100	474 / 474
Gene đã dự đoán	Gene kháng	Lớp kháng sinh bị kháng	Tương đồng (%)	Chiều dài HSP/Query
DMS06670_ctg_47	<i>aac(3)-IId</i>	Aminoglycoside	99.88	861 / 861
DMS06670_ctg_45	<i>bla_{CARB-2}</i>	Beta-lactam Alternate name; PSE-1, blaP1b	100.00	915 / 915
DMS06670_ctg_54	<i>bla_{OXA-58}</i>	Beta-lactam	100.00	843 / 843
DMS06670_ctg_1	<i>bla_{ADC-25}</i>	Beta-lactam	96.53	1152 / 1152
DMS06670_ctg_8	<i>bla_{OXA-68}</i>	Beta-lactam	100.00	825 / 825
DMS06670_ctg_41	<i>bla_{NDM-1}</i>	Beta-lactam	100.00	813 / 813
DMS06670_ctg_25	<i>mph(E)</i>	Macrolide	100.00	885 / 885
DMS06670_ctg_25	<i>msr(E)</i>	Macrolide, Lincosamide và Streptogramin B	100.00	1476 / 1476
DMS06670_ctg_45	<i>sul1</i>	Sulphonamide	100.00	927927

**Sàng lọc các gen
đề kháng kháng sinh**

Sàng lọc các gen đề kháng kháng sinh



Si-Tuan, N., Ngoc, H. M., Hang, P. T. T., Nguyen, C., Van, P. H., & Huong, N. T. (2017). New eight genes identified at the clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* DMS06669 strain in a Vietnam hospital. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 16(1), 74.

Sàng lọc các gen đề kháng kháng sinh

	Aminoglycoside													Beta-lactam																	quir	MLS-	Phenicol		ifampic	phonam	Tetracycline			Trimethoprim																						
	aacA4	aac(6')-II	aac(3)-IIa	aac(3)-IIa	strB	strA	aph(3')-Ic	armA	aadB	rmtB	aadA1	aadA16	aac(3)-IId	aph(3')-VIa	blaOXA-10	blaOXA-58	blaADC-25	blaOXA-64	blaVEB-1	blaVEB-7	blaNDM-1	blaOXA-66	blaOXA-109	blaPER-1	blaOXA-20	blaTEM-1D	blaOXA-65	blaTEM-1B	blaOXA-23	blaOXA-51	blaOXA-235	blaOXA-68	blaOXA-70	blaOXA-69	blaOXA-75	blaOXA-180	aac(6')/b-cr	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	ARR-2	ARR-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1								
ACICU	1															1	1					1			1												1												1													
1656-2		1	1		1	1											1					1		1	1																							1	1													
TCDC-AB0715	1		1		1	1	1				1						1					1					1												1								1	1			1											
BJAB0868	1				1	1	1	1			1						1					1				1					1								1	1	1	1					1	1			1											
BJAB07104	1				1	1	1	1	1		1						1					1									1								1	1	1	1					1	1			1											
TYTH-1	1				1	1		1			1						1					1																	1	1	1	1					1	1			1											
MDR-ZJ06	1		1		1	1	1	1			1						1					1									1								1	1	1	1							1		1											
AC29					1	1	1	1									1					1				1														1	1									1												
MDR-TJ	1		1		1	1		1			1						1					1									1								1	1	1	1							1	1			1									
AbH120-A2					1	1	1										1													1	1																		1													
ab030					1	1	1										1													1	1	1																1														
D1279779																	1																				1													1												
ATCC_17978																	1																					1												1												
ZW85-1														1			1					1																											1				1									
LAC-4					1	1			1								1																																1				1									
BJAB0715					1	1								1	1		1	1																														1				1										
DMS06669									1	1	1	1				1	1	1	1		1	1																1	1			1	1			1						1	1									
ab031					1	1											1																																1													
AB307-294																	1																																													
AB0057			1				1				1						1										1				1														1					1	1											
SDF																																																														
AYE			1		1	1	1		1		1				1		1		1																																											

Sàng lọc các gen đề kháng kháng sinh

	Aminoglycoside										Beta-lactam										quir	MLS -		Phenicol		ifampiciphonom		Tetracycline		trimethoprim																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
	aacA4	aac(6')II	aac(3)IIa	aac(3)IIa	strB	strA	aph(3')Ic	armA	aadB	rmtB	aadA1	aadA16	aac(3)IId	aph(3')IVa	blaOXA-10	blaOXA-58	blaOXC-25	blaOXA-64	blaYEB-1	blaYEB-7	blaNDM-1	blaOXA-66	blaOXA-109	blaPER-1	blaOXA-20	blaTEM-1D	blaOXA-65	blaTEM-1B	blaOXA-23	blaOXA-51	blaOXA-235	blaOXA-68	blaOXA-70	blaOXA-69	blaOXA-75	blaOXA-180	aac(6')Ib-cr	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
ACICU	1														1	1	1									1											1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
1656-2		1	1		1	1									1		1						1	1													1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
TCDC-AB0715	1		1		1	1	1				1				1		1					1		1				1								1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
BJAB0868	1				1	1	1	1			1				1		1					1				1			1							1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
BJAB07104	1				1	1	1	1			1				1		1					1				1			1							1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
TYTH-1	1				1	1		1			1				1		1					1				1			1							1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
MDR-ZJ06	1		1		1	1	1	1			1				1		1					1				1			1							1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
AC29					1	1	1	1							1		1					1				1										1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
MDR-TJ	1		1		1	1		1			1				1		1					1				1			1							1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
AbH120-A2				1	1	1									1		1					1				1		1	1								1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
ab030				1	1	1									1		1					1				1		1	1	1							1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
D1279779															1		1					1														1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
ATCC_17978															1		1					1														1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
ZW85-1														1		1					1																1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
LAC-4					1	1			1						1		1					1															1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
BJAB0715					1	1								1	1		1					1								1							1	mphE	msrE	catB8	catA1	floR	cmIA1	AMP-2	AMP-3	sul2	sul1	tet(A)	tet(B)	tet(G)	tet(39)	dfrA27	dfrA10	dfrA1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
DMSO6669	1										1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1</

Theo đó, *bla*_{OXA-10} và *bla*_{OXA-58} duy nhất được phát hiện ở DMS06669

Các vùng prophage ở *Acinetobacter baumannii*

Bảng 3. 30. Các vùng tiền thể thực khuẩn ở *A. baumannii* DMS06669 và DMS06670

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

Gene độc lực ở *Acinetobacter baumannii*

Các kết quả từ PathogenFinder của hệ gen *A. baumannii* DMS06669 và DMS06670

Các đặc điểm	Giá trị ở DMS06669	Giá trị ở DMS06670
Xác suất trở thành tác nhân gây bệnh ở người (%)	85.8	85.3
Độ bao phủ protein đầu vào (%)	15.48	17.11
Các họ protein gây bệnh có tương đồng	632	622
Các họ protein gây bệnh không tương đồng	1	0
Số lượng các trình tự	4,090	3,636
Tổng chiều dài các trình tự (bp)	1,280,033	1,128,874
Chiều dài trình tự dài nhất (bp)	4,877	3,452
Chiều dài trình tự ngắn nhất (bp)	30	31
Trung bình chiều dài của các trình tự (bp)	312.0	310.0

Các IS ở *Acinetobacter baumannii*

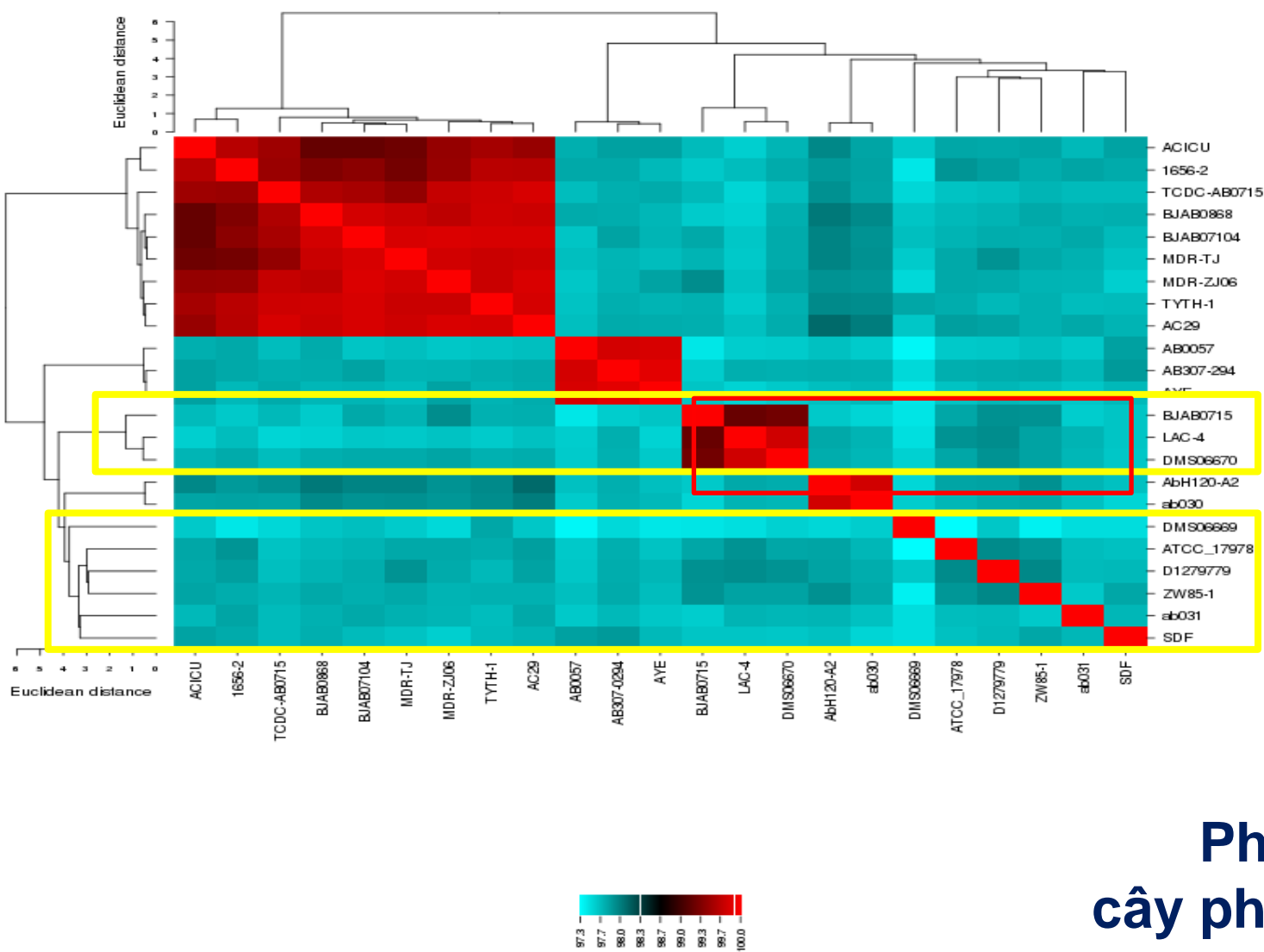
Bảng 3. 34. Những trình tự chèn (IS) ở *Acinetobacter baumannii* DMS06669

STT	Trình tự chèn (IS)	Họ IS	Nhóm	Nguồn gốc	Score (bit)	E-value
1	IS<i>Aba1</i>	IS4	IS10		1223	1e-187
2	IS <i>Aba2</i>	IS3	IS51		95,6	3e-17
3	IS <i>Aba3</i>	IS1	IS51		347	2e-93
4	IS <i>Aba5</i>	IS5	IS903		95,6	1e-17
5	IS <i>Aba7</i>	IS5	IS903		52,0	4e-04
6	IS <i>Aba12</i>	IS5	IS903	<i>A. baumannii</i>	394	1e-107
7	IS <i>Aba13</i>	IS5	IS903		115	2e-23
8	IS <i>Aba14</i>	IS3	IS150		54	7e-05
9	IS <i>Aba16</i>	IS66	IS903		492	6e-137
10	IS <i>Aba17</i>	IS66	IS903		424	1e-116
11	IS <i>Aba18</i>	IS3	IS51		73,8	1e-10
12	IS <i>Aba19</i>	IS3	IS51		105	3e-20
13	IS <i>Aba21</i>	IS3	IS3		97,6	8e-18
14	IS <i>Aba22</i>	IS3	IS3		79,8	2e-12
15	IS <i>Aba25</i>	IS66	IS903		492	6e-137
16	IS <i>Aba29</i>	IS3	IS51		85,7	3e-14
17	IS <i>Aba32</i>	ISNCY	IS1202		97,6	5e-19
18	IS <i>Aba34</i>	IS3	IS51		95,6	3e-17
19	IS <i>Aba40</i>	IS5	IS903		113	6e-23
20	IS <i>Aba43</i>	ISL3	ISAzba1		168	4e-41

Các IS ở *Acinetobacter baumannii*

Bảng 3. 35. Những trình tự chèn (IS) ở *Acinetobacter baumannii* DMS06670

STT	Trình tự chèn (IS)	Họ IS	Nhóm	Nguồn gốc	Score (bit)	E-value
1	ISAba1	IS4	IS10	<i>A. baumannii</i>	305	3e-81
2	ISAba2	IS3	IS51		103	2e-19
3	ISAba3	IS1	IS51		973	0,001
4	ISAba7	IS5	IS903		52,0	5e-04
5	ISAba8	IS21	IS1202		69,9	3e-10
6	ISAba18	IS3	IS51		696	1e-187
7	ISAba18	IS3	IS51		79,8	2e-12
8	ISAba19	IS3	IS51		101	6e-19
9	ISAba21	IS3	IS3		83,8	1e-13
10	ISAba22	IS3	IS3		69,9	2e-09
11	ISAba26	IS256	ISPna2		337	6e-90
12	ISAba27	IS5	ISL2		345	4e-93
13	ISAba29	IS3	IS51		91,7	6e-16
14	ISAba32	ISNCY	IS1202		147	2e-33
15	ISAba33	IS4	IS10		509	1e-142
16	ISAba34	IS3	IS51		115	4e-23
17	ISAba125	IS30	ISPna2		109	1e-21

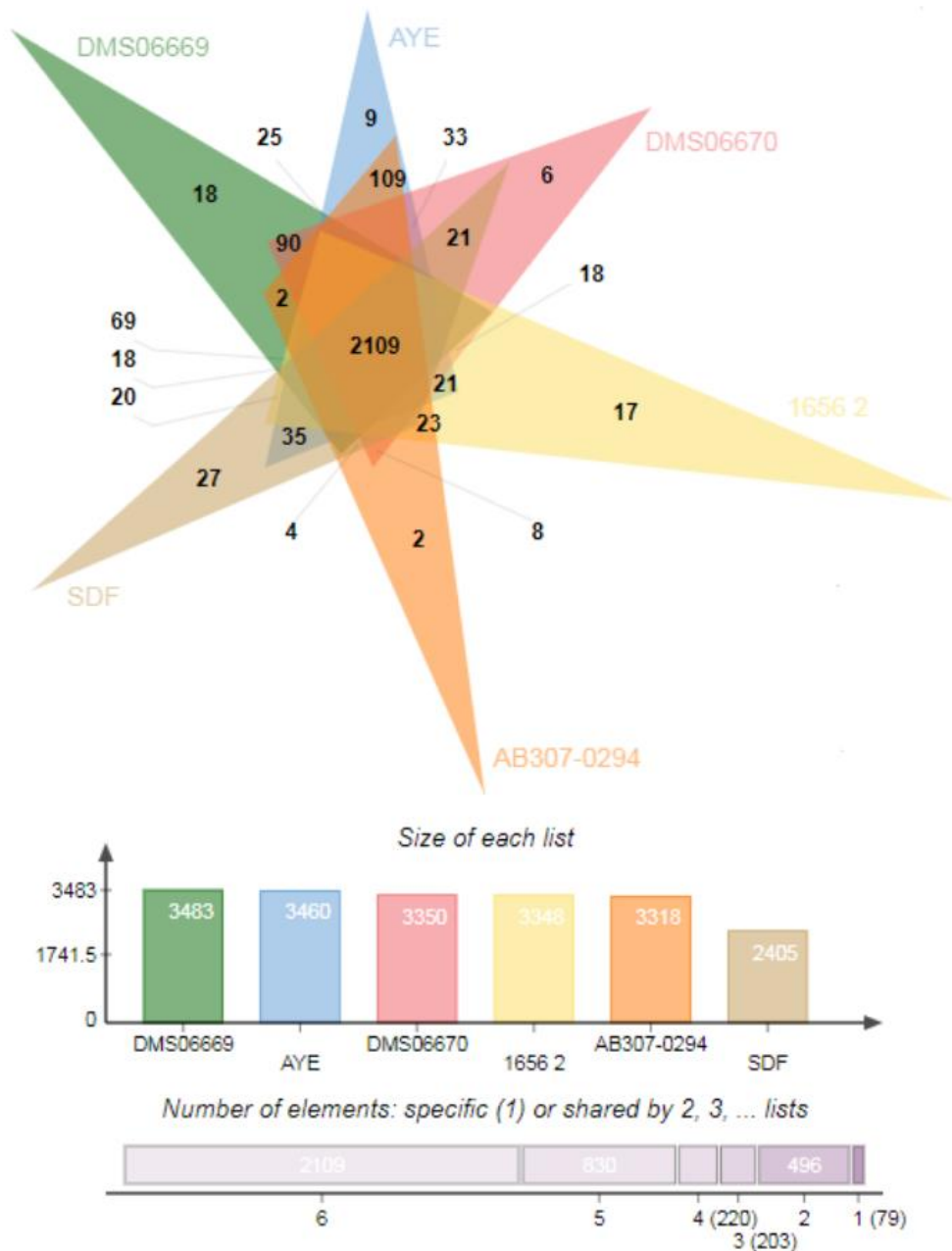


Phân tích cây phát sinh loài

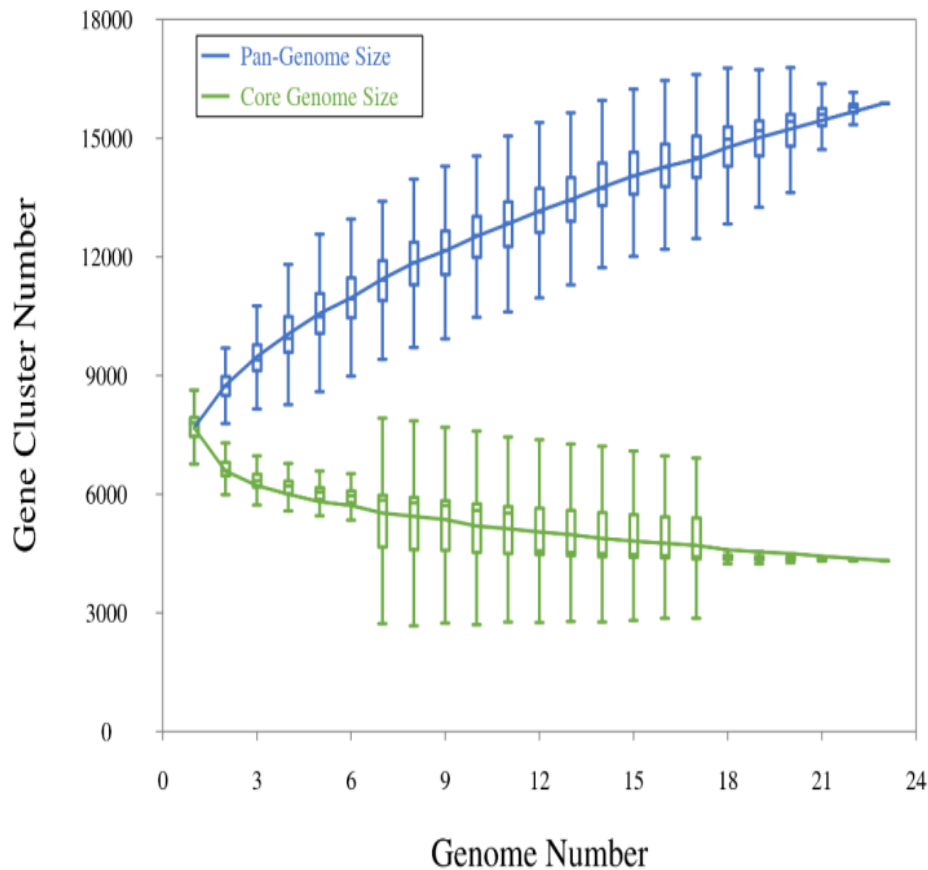
Hình 3. 6. Cây phát sinh loài của *Acinetobacter baumannii* DMS06669; DMS06670 và 21 chủng *A. baumannii* hiện hành trong cơ sở dữ liệu KEGG dựa trên các giá trị trung bình độ tương đồng nucleotide (ANI).

Si-Tuan, N., Ngoc, H. M., Hang, P. T. T., Nguyen, C., Van, P. H., & Huong, N. T. (2017). New eight genes identified at the clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* DMS06669 strain in a Vietnam hospital. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 16(1), 74. 36

Phân tích gen ortholog ở *A. baumannii*



Hình 3. 22. So sánh hệ protein giữa các chủng *A. baumannii*: DMS06669; DMS06670; AYE, SDF, 1656-2, AB307-0294. Biểu đồ Venn và biểu đồ thanh đại diện cho số lượng các gene orthologous trực giao và duy nhất của mỗi chủng



Phân tích pan-genome ở *A. baumannii*

Pan-genome: 15883

Core-genome: 4321

Accessory genome: 11562

Pan=core+accessory

Hình 3. 23. Tổng số gene trong pan-geneome (màu xanh blue) và bộ gene chính (core-geneome, màu xanh green) được vẽ như 1 hàm số của số lượng bộ gene được thêm vào tuần tự (23 bộ gene). Biểu đồ hộp (box plot) biểu thị tỷ lệ % thứ 25 và thứ 75 với các trung vị được biểu thị dưới dạng đường nằm ngang và râu (whisker) nằm ở các phần trăm thứ 10 và thứ 90. Hơn nữa, như thể hiện trong hình 3.25 bên dưới, số lượng gene mới không bao phủ tới mức zero (không) khi sắp xếp các chủng mới (trong 23 chủng, trung bình có khoảng 211 gene mới được đóng góp vào ngân hàng gene). Để hỗ trợ cho những quan sát này, phân tích đường cong pan-geneome bằng mô hình hồi quy lũy thừa (power-law) cho thấy pan-geneome là hệ mở ($B_{pan}=0,44$).

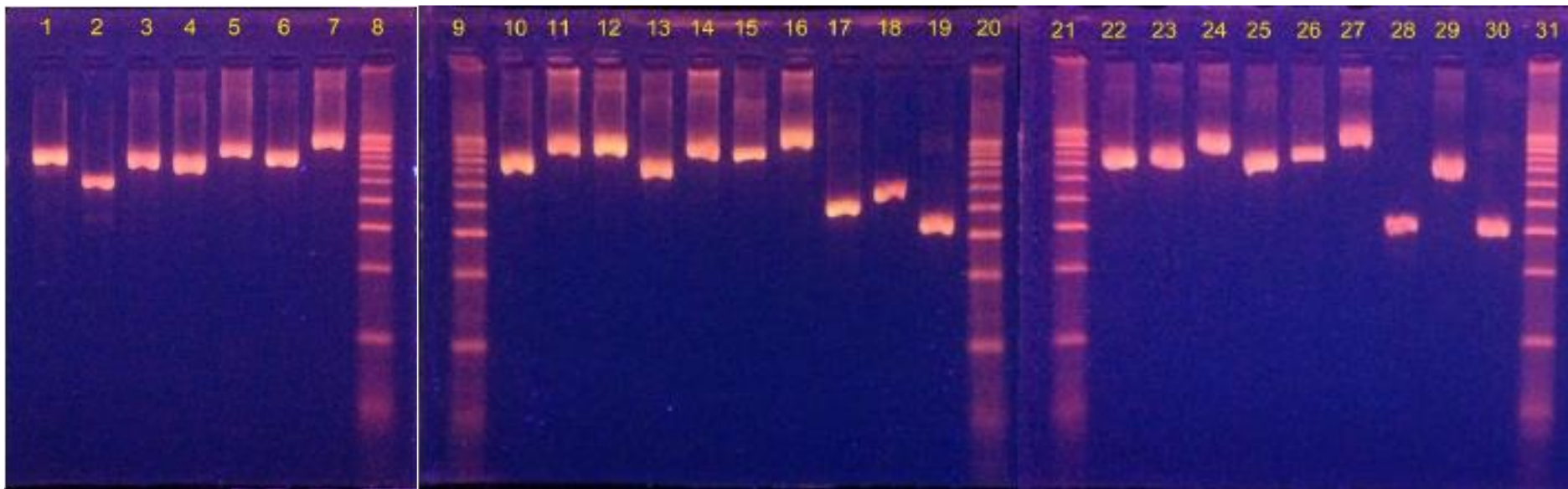
TÓM LẠI

- ❖ Hệ gene DMS06669 và DMS06670 lần lượt có 24 scaffold và 16 scaffold.
- ❖ Về gene kháng thuốc, DMS06669 có 18 gene và DMS06670 có 9 gene.
- ❖ Tổng cộng có 632 và 622 họ gây bệnh tương đồng với các trình tự hệ gene hoàn chỉnh của chủng *Acinetobacter baumannii* DMS06669 và DMS06670.
- ❖ DMS06669 có 4 prophage và DMS06670 có 2 prophage.
- ❖ DMS06669 có phát sinh loài trong nhánh 6 chủng gồm ATCC_17978, D1279779, ZW85-1; ab031 và SDF. DMS06670 có phát sinh loài trong nhánh gồm LAC-4 và BJAB0715

TÓM LẠI

- ❖ Về IS, DMS06669 có 20 trình tự chèn và DMS06670 có 17 trình tự chèn.
- ❖ Về ortholog gene, các COG duy nhất ở DMS06669 là các gene hoạt động với hoạt tính của sarcosine oxidase, 2-oxopent-4-enoate hydratase, amino-methyl-transferase và ammonium transmembrane transporter.
- ❖ Và, DMS06670 chứa các COG duy nhất là các gene chức năng với hoạt tính 2,5-dioxovalerate dehydrogenease (NADP+), ATPase phụ thuộc RNA.
- ❖ Pan-genome của *A. baumannii* gồm 15883 gene, trong khi core và accessory genome gồm 4321 và 11562 gene.
- ❖ Pan-genome của *A. baumannii* có đặc trưng của 1 hệ pan-genome mở.

Khuếch đại các gen đề kháng kháng sinh từ kết quả *in-silico* ở các chủng *Acinetobacter baumannii* đặc trưng bằng phương pháp thực nghiệm Sinh học Phân tử



Hình 3. 11. PCR khuếch đại các gen đề kháng kháng sinh ở 2 chủng *A. baumannii* DMS06669 và *Acinetobacter baumannii* DMS06670. Chú thích các gen bên dưới:

- | | | | |
|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1. <i>aadA16</i> (846bp) | 2. <i>aadB</i> (534bp) | 3. <i>aadA1</i> (792bp) | 4. <i>rmtB</i> (756bp) |
| 5. <i>blaVEB7</i> (900bp) | 6. <i>blaOXA10</i> (801bp) | 7. <i>blaADC25</i> (1152bp) | 8, 9. Ladder |
| 10. <i>blaOXA64</i> (825bp) | 11. <i>cmlA1</i> (1260bp) | 12. <i>floR</i> (1215bp) | 13. <i>sul1</i> (840bp) |
| 14. <i>tet(39)</i> (1120bp) | 15. <i>mph(E)</i> (885bp) | 16. <i>msr(E)</i> (1476bp) | 17. ARR-3 (453bp) |
| 18. <i>dfA27</i> (474bp) | 19. 16S-DMS06669 | 20, 21, 31. Ladder | 22. <i>aac(3)-II</i> (861bp) |
| 23. <i>blaCARB2</i> (915bp) | 24. <i>blaADC25</i> (1152bp) | 25. <i>blaOXA68</i> (825bp) | 26. <i>mph(E)</i> (885bp) |
| 27. <i>msr(E)</i> (1476bp) | 28. <i>sul1</i> (348bp) | 29. <i>sul1</i> (840bp) | 30. 16S-DMS06670 |

**Xác nhận trình tự các gen đề kháng kháng sinh *in-vitro*
ở các chủng *Acinetobacter baumannii* đặc trưng bằng
phương pháp Sanger cải tiến**

Các gen đề kháng kháng sinh carbapenem

- *blaOXA10* của *A. baumannii* DMS06669 có nguồn gốc tương đương với cả 27 chủng.
- *blaOXA64* của *A. baumannii* DMS06669 có nguồn gốc gần nhất với *blaOXA64* của chủng *A. baumannii* KP890935.1.
- *blaOXA68* của *A. baumannii* DMS06669 có nguồn gốc gần nhất với *blaOXA68* của chủng *A. baumannii* NG_049808.1 và AY750910.1

Các gen đề kháng kháng sinh lớp β -lactam

- *blaOXA58* của *A. baumannii* DMS06669 có nguồn gốc gần nhất với *A. baumannii* AGQ08547.1.
- *blaOXA58* của *A. baumannii* DMS06670 có nguồn gốc gần nhất với *A. baumannii* ABP87781.2.
- *blaNDM1* của *A. baumannii* DMS06669 có nguồn gốc gần nhất với *NDM1_partial_plasmid* AFN84619.1.
- *blaNDM1* của *A. baumannii* DMS06670 có nguồn gốc gần nhất với *NDM1_partial_Klebsiella pneumoniae* ADW41799.1.

- *blaCARB2* của *A. baumannii* DMS06670 có nguồn gốc gần nhất với duy nhất chủng *P. aeruginosa* NG_048722.1

TÓM LẠI

- ❖ Trong các gen *in-silico* ở DMS06669 và DMS06670, chỉ có [aac(3)-IId ở DMS06670] là không tìm được chủng vi khuẩn tương đồng có chứa gen aac(3)-IId.
- ❖ 22/23 gen *in-silico* đã được phân lập *in-vitro* và xác nhận lại bằng Sanger cải tiến. aac(3)-IId ở DMS06670 không thấy trên NCBI có thể mã mở đầu, mã kết thúc của gen aac(3)-IId không nằm trong các trình tự được dò.
- ❖ Trong 22 gen được phân lập *in-vitro*, có 3 gen trùng nhau. Do đó, tổng cộng có 19 gen kháng kháng sinh ở 2 chủng *A. baumannii* đặc trưng về tính kháng carbapenem bằng các phương pháp thực nghiệm sinh học phân tử.

5.1. Kết luận

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

DMS06669	DMS06670
24 scaffold; 4.207.939bp	16 scaffold; 4.207.939bp
4101 CDS; 18 gen kháng kháng sinh (8 gen mới)	3643 CDS; 9 gen kháng kháng sinh (<i>blaCARB2</i> mới)
4 prophage, 20 IS, 632 protein gây bệnh ở người, 573 protein đặc trưng loài	2 prophage, 17 IS, 622 protein gây bệnh ở người, 273 protein đặc trưng loài
ATCC_17978; D1279779; ZW85-1; ab031 và SDF	LAC-4 và BJAB0715
pan-genome 23 hệ gen đã có sẵn (bao gồm hệ gen DMS06669 và DMS06670) có sự gia tăng 211 gen	

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

- ❖ PCR đã giúp khuếch đại *in-vitro* được 19 gen kháng thuốc của chủng hai chủng DMS06669, DMS06670.
- ❖ Trình tự các gen được xác nhận lại bằng phương pháp Sanger cải tiến.

5.2. Kiến nghị

5.2. Kiến nghị

❖ Phân lập và khảo sát các gene liên quan đến:

- Độc lực vi khuẩn, các trình tự chèn (IS)
- Gen mã hóa các vùng tiền thể thực khuẩn,
- Gen mã hóa các protein gây bệnh đặc trưng loài.

→ Hiểu rõ hơn cơ chế sinh bệnh học mức độ phân tử.

CÁC ĐÓNG GÓP CỦA ĐỀ TÀI

- ❖ Có 9 gen đề kháng kháng sinh chưa từng được công bố trong 1 chủng *A. baumannii* trước đây, trong đó có 2 gen mới liên quan đến đề kháng nhóm kháng sinh beta-lactam → Nghiên cứu lưu hành chủng, dấu ấn sinh học phân tử kháng thuốc và khảo sát phổ kháng khuẩn tiềm năng.
- ❖ Dữ liệu giải trình tự hệ gene cũng phát hiện các vùng tiền thể thực khuẩn ở *A. baumannii*, các IS và các protein đặc trưng loài → nghiên cứu tiếp theo về cơ chế sinh bệnh học phân tử *A. baumannii*.

CÁC CÔNG BỐ QUỐC TẾ

1. **Si-Tuan, N.**, Ngoc, H. M., Hang, P. T. T., Nguyen, C., Van, P. H., & Huong, N. T. (2017). New eight genes identified at the clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* DMS06669 strain in a Vietnam hospital. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 16(1), 74. [ISI-SCIE]
2. Anh, N. T., Nga, T. V. T., Tuan, H. M., **Tuan, N. S.**, Chau, N. V. V., Baker, S., & Duong, H. H. T. (2017). Molecular epidemiology and antimicrobial resistance phenotypes of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients in three hospitals in southern Vietnam. *Journal of medical microbiology*, 66(1), 46-53. [ISI-SCI]
3. **Si-Tuan, N.**, Thanh, N. N., Hang, P. T. T., Van Dung, P., & Huong, N. T. (2016). Antimicrobial resistance patterns among *Acinetobacter baumannii* isolated from Thong Nhat Dong Nai General Hospital. *Orthopedics*, 2(3), 61-75.

CÔNG BỐ
SẮP TỚI

Genomic features, phylogenetic relationships, and comparative genomics of a clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain in a Vietnam hospital
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MCRO-D-18-00276R1
Full Title:	Genomic features, phylogenetic relationships, and comparative genomics of a clinical multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> strain in a Vietnam hospital
Article Type:	Research article
Section/Category:	Microbial genetics, genomics and proteomics
Funding Information:	
Abstract:	<p>Background</p> <p><i>Acinetobacter baumannii</i>, an emerging infectious agent in humans, is a major cause of hospital-acquired infections worldwide due to its impressive propensity to rapidly acquire resistance elements to a wide range of antimicrobial agents. We sought to explore the genomic properties, phylogenetic relationships, and comparative genomics of this pathogen. For this purpose, <i>A. baumannii</i> strain DMS06670 was isolated from a sputum specimen obtained from a male patient with hospital-acquired pneumonia.</p> <p>Results</p> <p>Assembly of whole-genome shotgun sequences of strain DMS06670 yielded an estimated genome size of 3.8 Mb. Functional annotation and orthologous protein cluster analysis identified a number of antibiotic resistance genes, prophage regions, and virulence factors, which corresponded with the antibiotic susceptibility phenotype of this strain. Phylogenetic analysis revealed that, based on the average nucleotide identity value, <i>A. baumannii</i> DMS06670 is a sister group to the LAC-4 and BJAB0715 strains of <i>A. baumannii</i>. Comparative analysis of 23 available genomes of <i>A. baumannii</i> revealed a pan-genome consisting of 15,883 genes.</p> <p>Conclusions</p> <p>Genome sequencing, de novo assembly, functional annotation and comparative analysis of <i>Acinetobacter baumannii</i> strain DMS06670 were performed with standard bioinformatics software. Our findings provide insight into the molecular mechanisms leading to antibiotic resistance in <i>A. baumannii</i>.</p>
Corresponding Author:	Nguyen Si-Tuan Thongnhat Dongnai General Hospital VIET NAM
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Thongnhat Dongnai General Hospital
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Nguyen Si-Tuan

CẢM ƠN QUÝ THẦY CÔ!