

**PHỐI HỢP KHÁNG SINH *IN-VITRO*  
LÊN *ACINETOBACTER BAUMANNII*  
KHÁNG CARBAPENEM GÂY VPBV VÀ  
MỐI LIÊN QUAN VỚI GEN MÃ HÓA CARBAPENEMASE**

TS. NGUYỄN SĨ TUẤN VÀ CÁC CỘNG SỰ  
*BỆNH VIỆN ĐA KHOA THỐNG NHẤT TỈNH ĐỒNG NAI*  
*BAN CHẤP HÀNH HỘI VI SINH LÂM SÀNG TP. HCM*

*TP. HCM, THÁNG 12 NĂM 2019*

# NỘI DUNG

TỔNG QUAN - ĐẶT VẤN ĐỀ

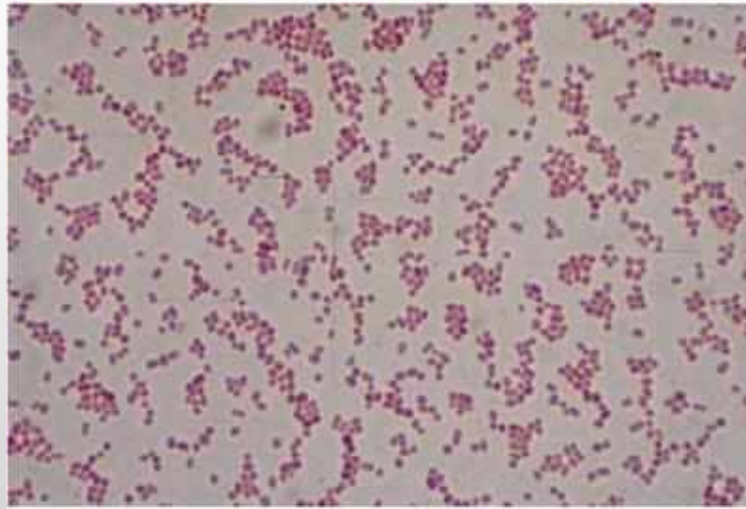
MỤC TIÊU

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

KẾT LUẬN

# 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

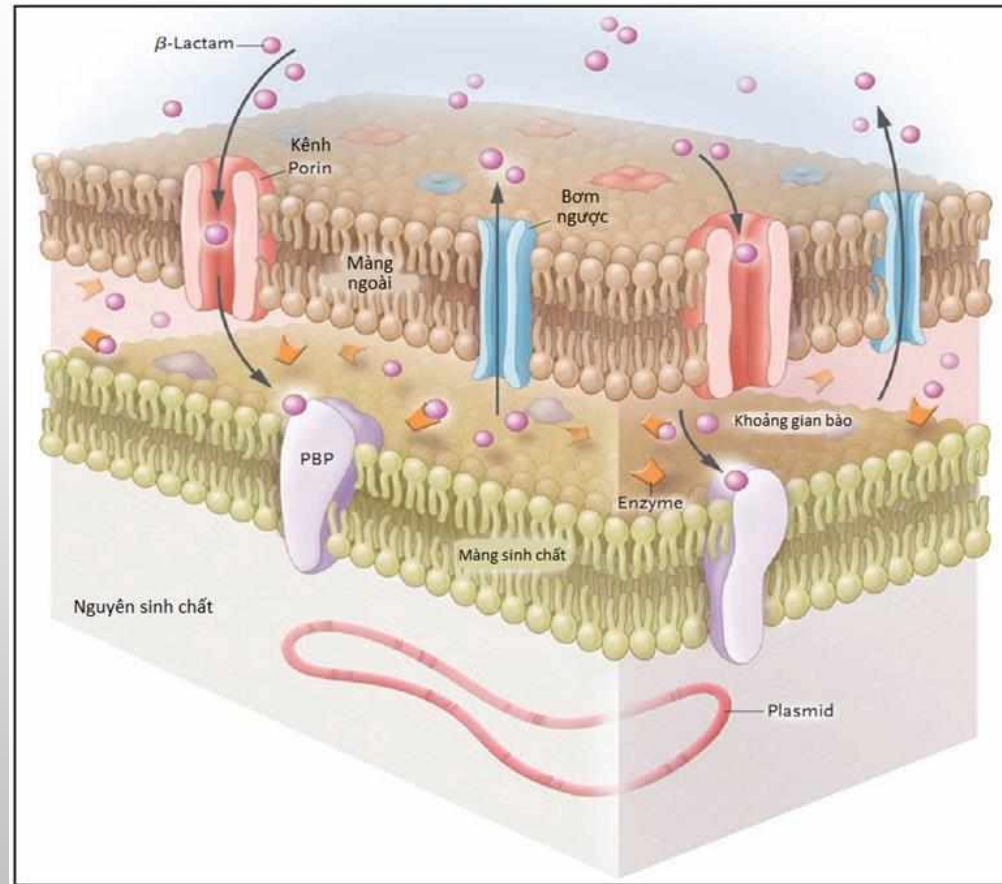
## Các điểm đặc trưng của giống *Acinetobacter*

Test	<i>A. baumannii</i>	<i>A. lwoffii</i>
Oxidase	-	-
Di động	-	-
Phát triển trên thạch MacConkey	+	+
Phát triển ở 42°C	+	-
OF glucose	+	-
Khử NO <sub>3</sub>	-	-
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

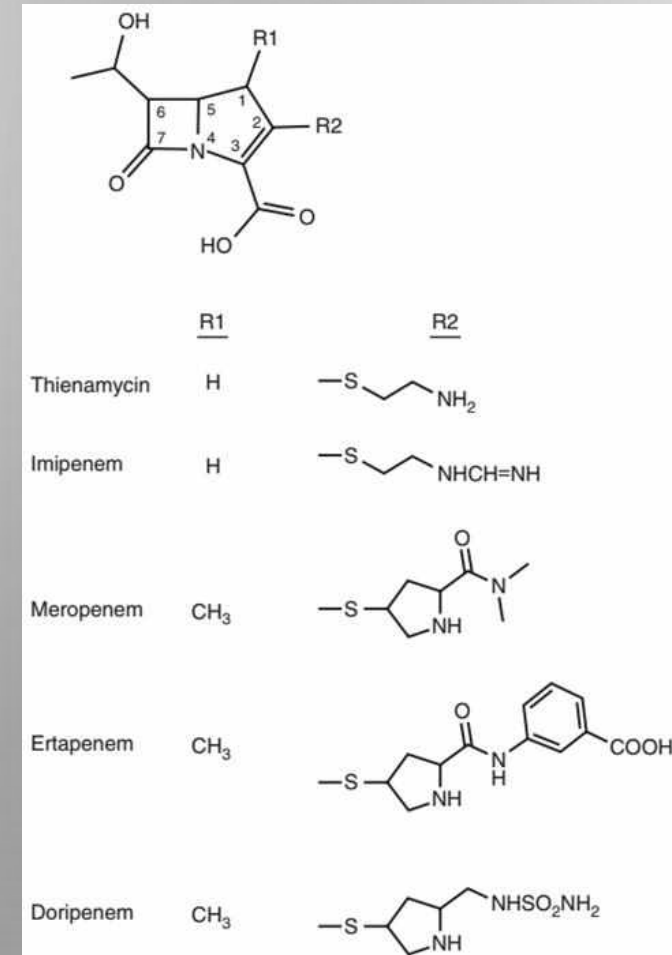


## Các cơ chế đề kháng kháng sinh chủ yếu ở *Acinetobacter*

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

# KHÁNG SINH CARBAPENEM

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



## 1. Tổng quan

# CARBAPENEM – “THE BIG GUN”

## 1. Tổng quan

- Ertapenem
- Imipenem
- Meropenem
- Doripenem



# 1. Tổng quan

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

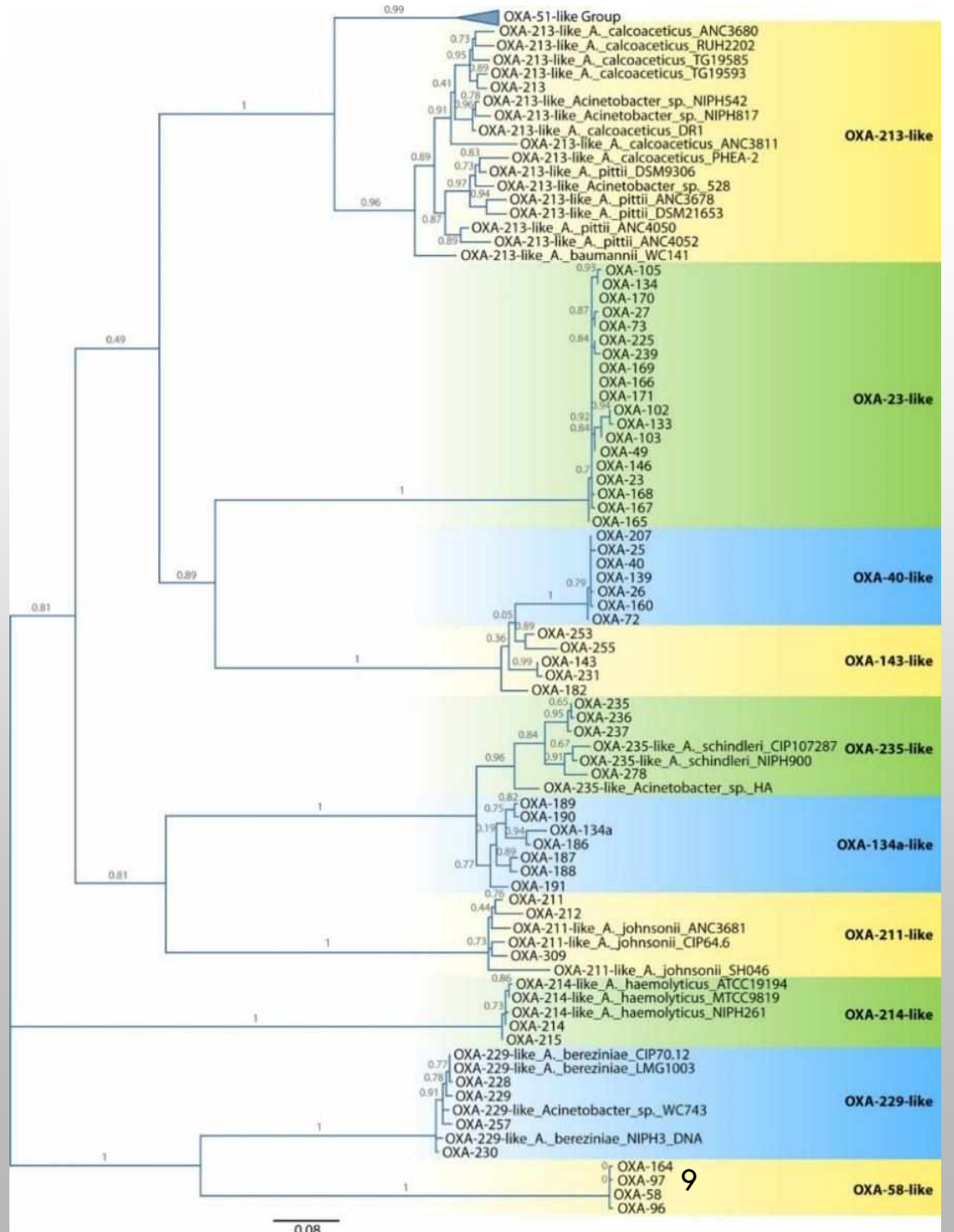
## Nhóm $\beta$ -lactamase thủy phân $\beta$ -lactam, Marsik và Nambiar, 12/2011

Nhóm Ambler	Nhóm Bush- Jacoby	Tên chung	Kháng trung gian với	Các ví dụ
A	2f	Serine carbapenemase	Carbapenem, penicillin, cephalosporin, aztreonam	<b>KPC</b> , GES, SME
B	3a	Metallo-carbapenemase	Tất cả $\beta$ -lactam, ngoại trừ aztreonam	IMP, <b>NDM</b> , VIM, IND
C	1	Serine cephalosporinase	Penicillin, cephalosporin, gồm cefoxitin, cefotetan, cetrixone, cefotaxime	AmpC
D	2df	Carbapenemase	Carbapenem, penicillin, cephalosporin, aztreonam	<b>OXA</b>

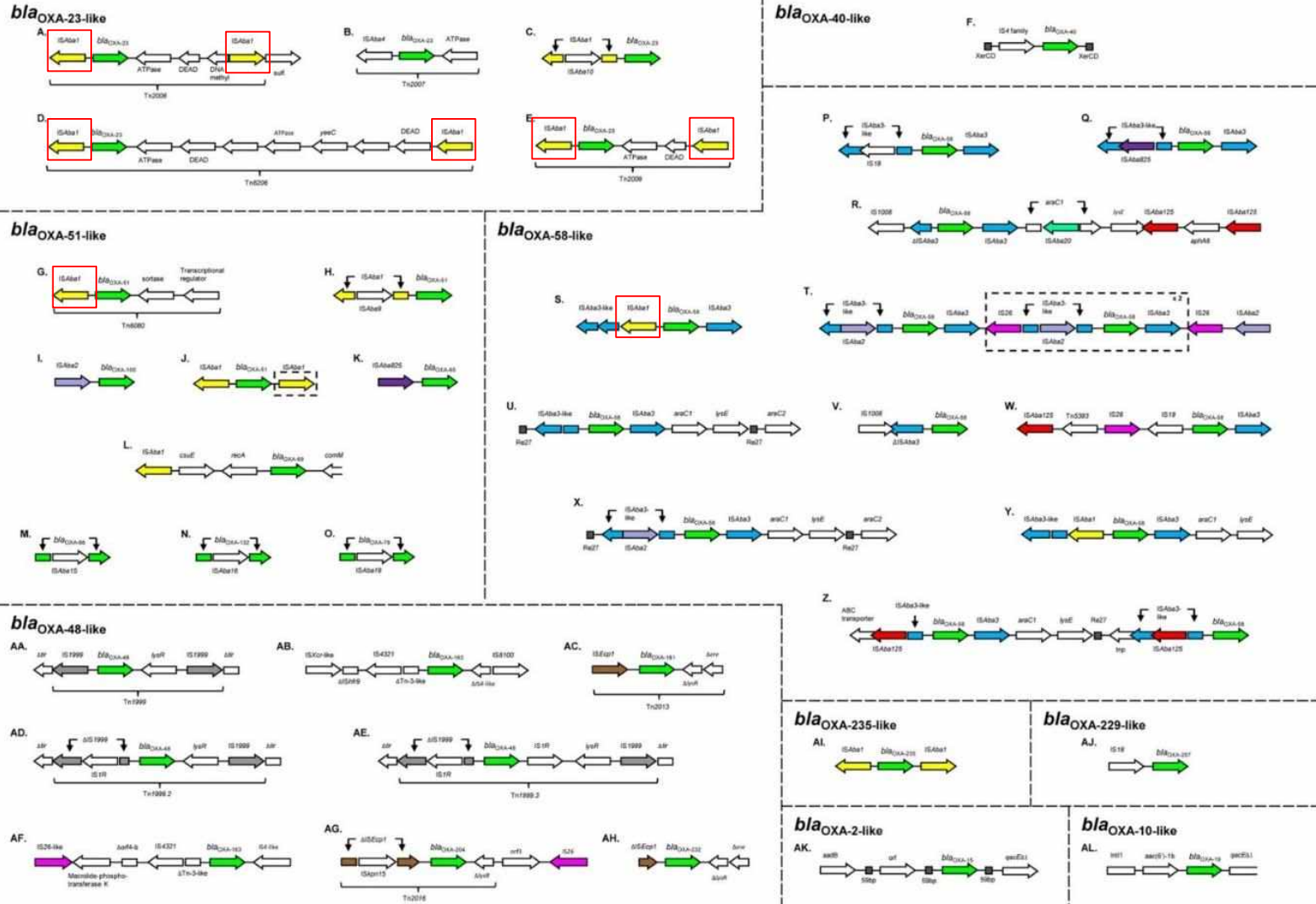


# 1. Tổng quan

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



# 1. Tổng quan



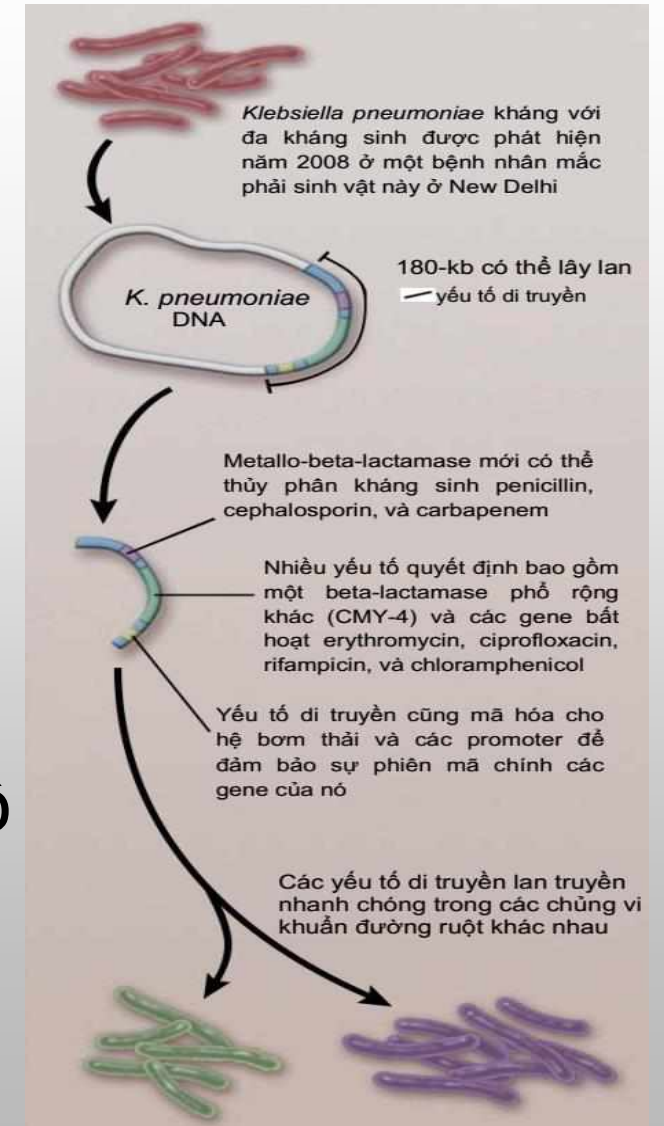
B. A. Evans and S. G. Amyes, "OXA  $\beta$ -lactamases," *Clinical microbiology reviews*, vol. 27, pp. 241-263, 2014.

# 1. Tổng quan

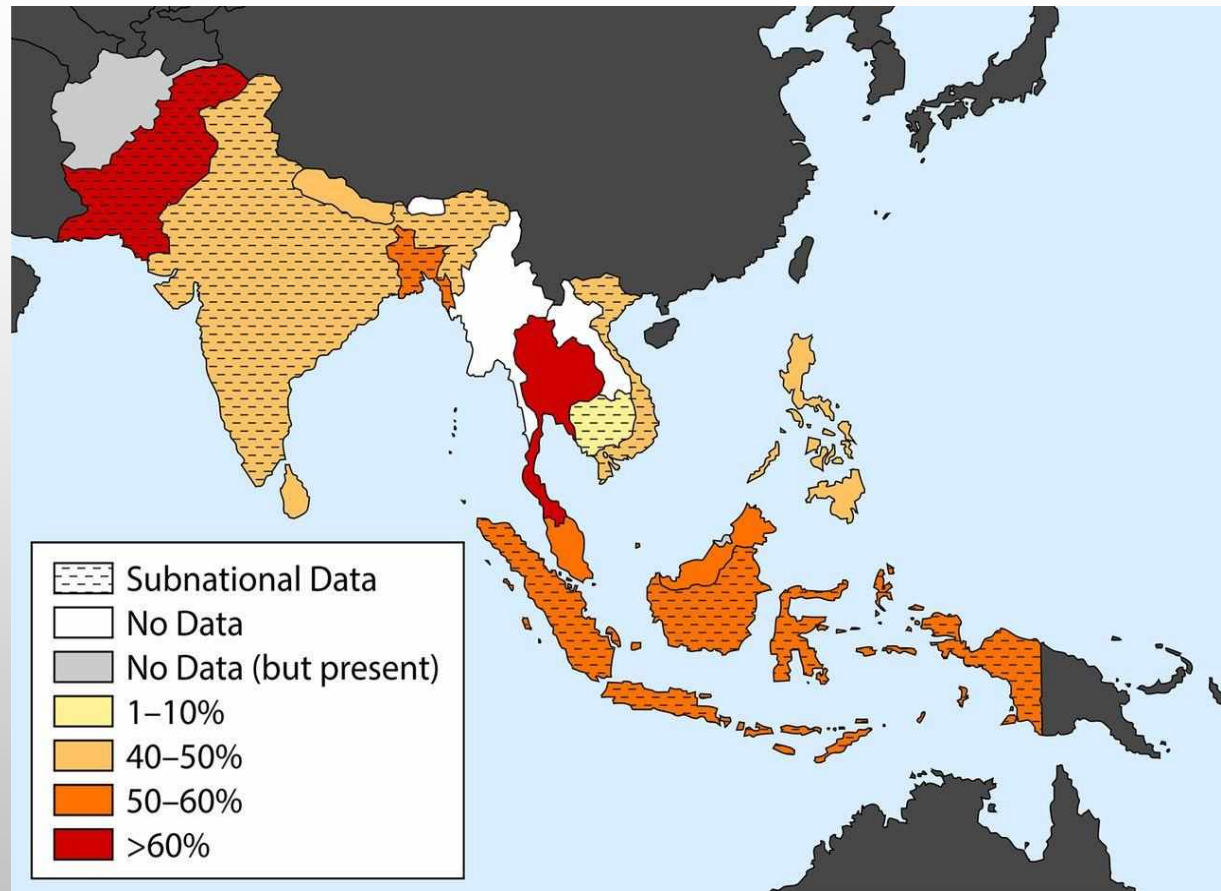
Có 7 biến thể NDM tồn tại (NDM-1 tới NDM-7).

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. Tổng quan



Tỷ lệ ước tính *A. 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

- NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG *IN-VITRO* CÁC PHỐI HỢP KHÁNG SINH LÊN *A. BAUMANNII* ĐỀ KHÁNG CARBAPENEM;
- XÁC ĐỊNH TỶ LỆ CÁC GEN LIÊN QUAN ĐẾN KHÁNG CARBAPENEM Ở *A. BAUMANNII* ĐỀ KHÁNG CARBAPENEM;
- MỐI LIÊN QUAN GIỮA CÁC TỶ LỆ TÁC DỤNG *IN-VITRO* VỚI CÁC GEN MÃ HÓA CARBAPENEMASE.

# 3. Vật liệu và phương pháp

## 3.1. ĐỊNH DANH VÀ KHÁNG SINH ĐỒ A. BAUMANNII BẰNG BD PHOENIX™

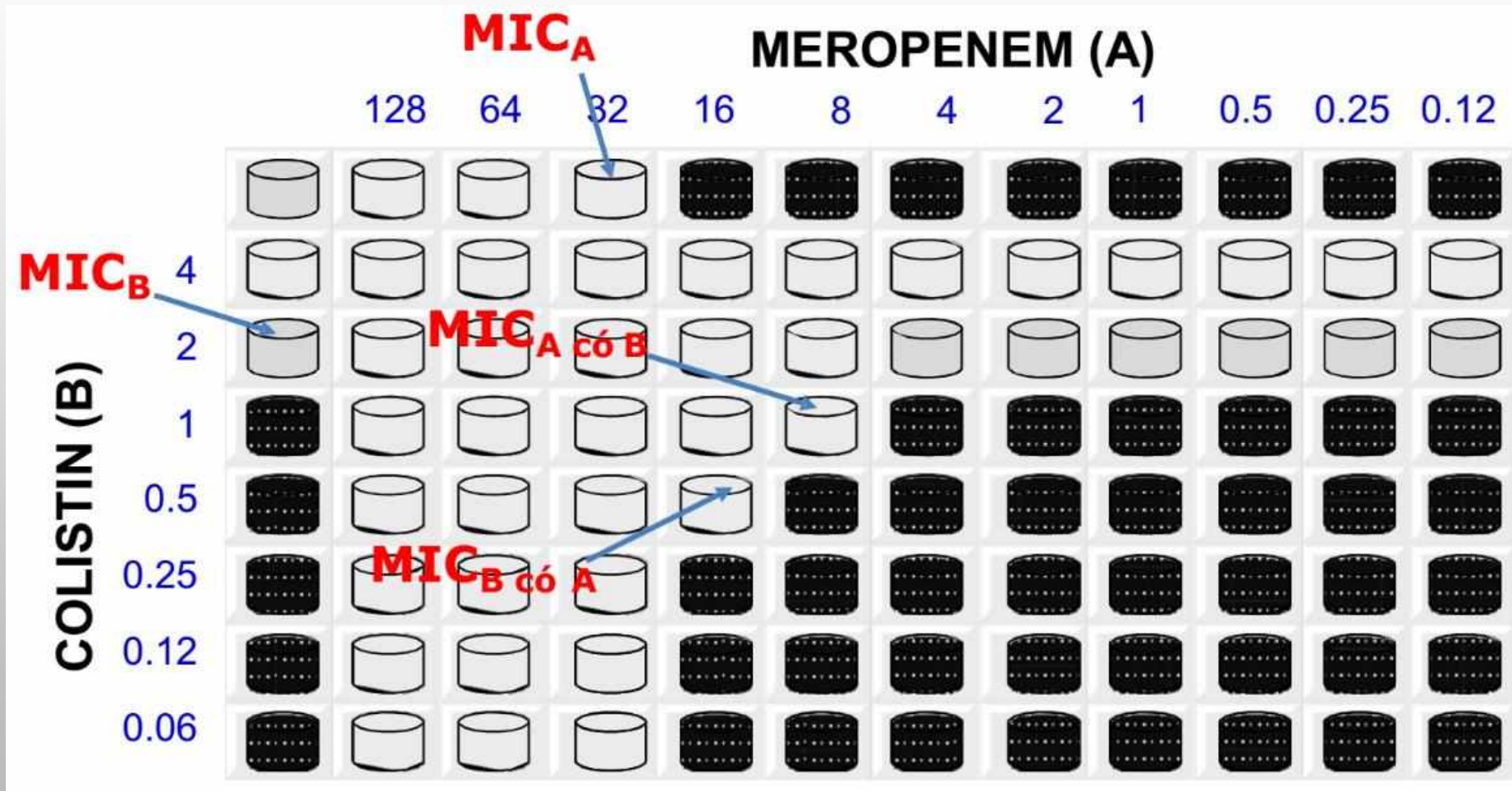
- Định danh kết hợp hóa phát quang + hóa sinh học cổ điển → tính chất sv hoá học của vsv qua thay đổi màu sắc môi trường.
- KSD kết hợp oxy hóa khử và đo độ đục → phát triển của VSV trong các giếng của card. Nồng độ KS tính theo cấp số nhân. Kết quả làm KSD là trị số MIC cho 15-25 loại kháng sinh.
- Chi tiết quy trình thực hiện được trình bày trong phụ lục 1 về “Quy trình nuôi cấy, định danh và kháng thuốc hệ thống tự động” do BVĐKTNĐN ban hành ngày 17 tháng 04 năm 2015.

## 3.2. PHƯƠNG PHÁP PHỐI HỢP KHÁNG SINH

KS*	NĐ*	KH*	Meropenem, µg/ml												
			0	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	
Colistin, µg/ml	0	A	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	4	B	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	2	C	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	1	D	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	0,5	E	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	0,25	F	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	0,12	G	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	0,06	H	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

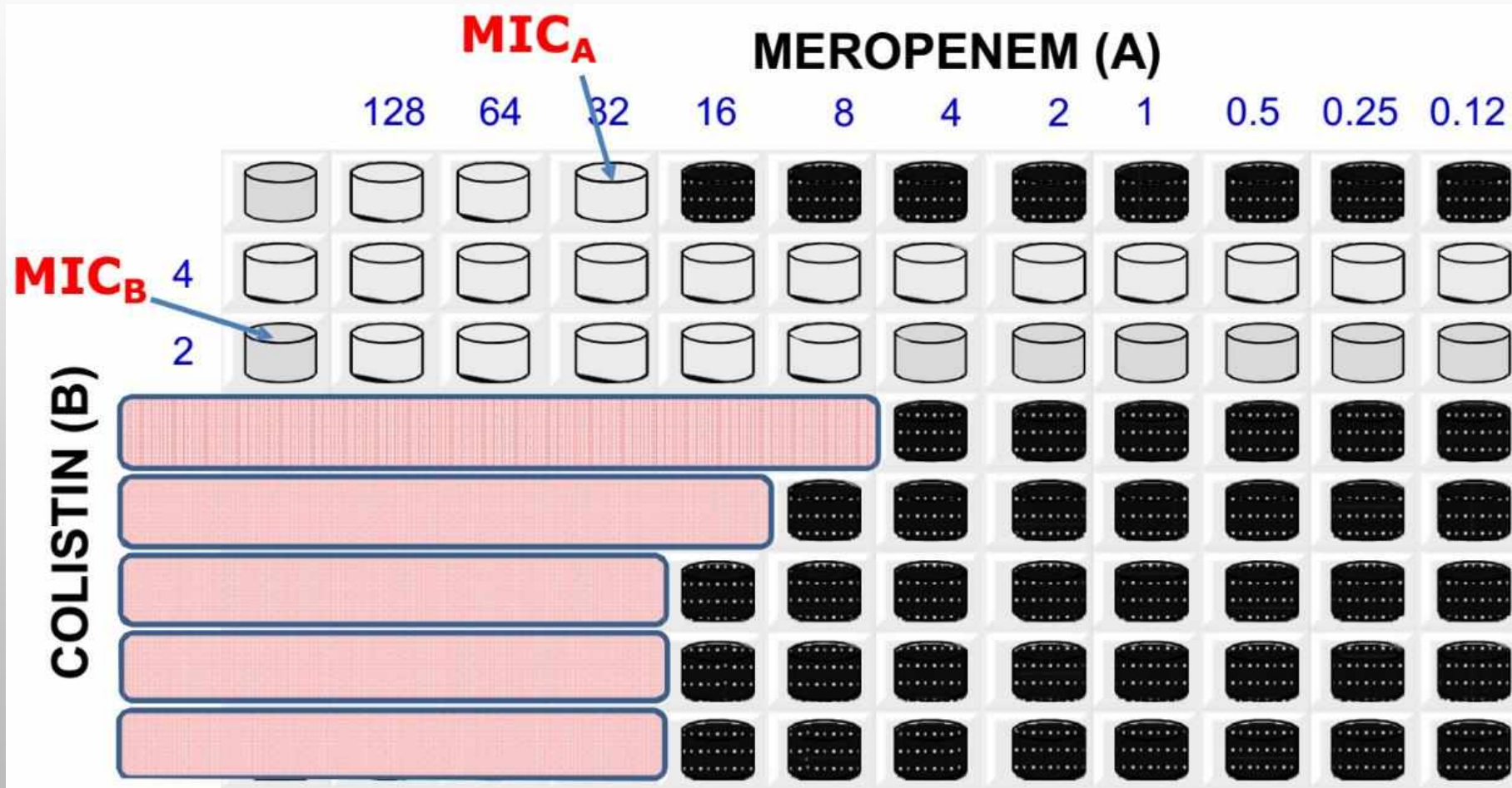
\* KS = Loại kháng sinh; NĐ = Nồng độ kháng sinh; KH = ký hiệu.

## 3.2. PHƯƠNG PHÁP PHỐI HỢP KHÁNG SINH





## 3.2. PHƯƠNG PHÁP PHỐI HỢP KHÁNG SINH



## 3.2. PHƯƠNG PHÁP PHỐI HỢP KHÁNG SINH

FIC index (Fractional Inhibition Concentration) theo công thức:

$$\text{FIC index} = \text{FIC}_{\text{colistin}} + \text{FIC}_{\text{meropenem}}$$

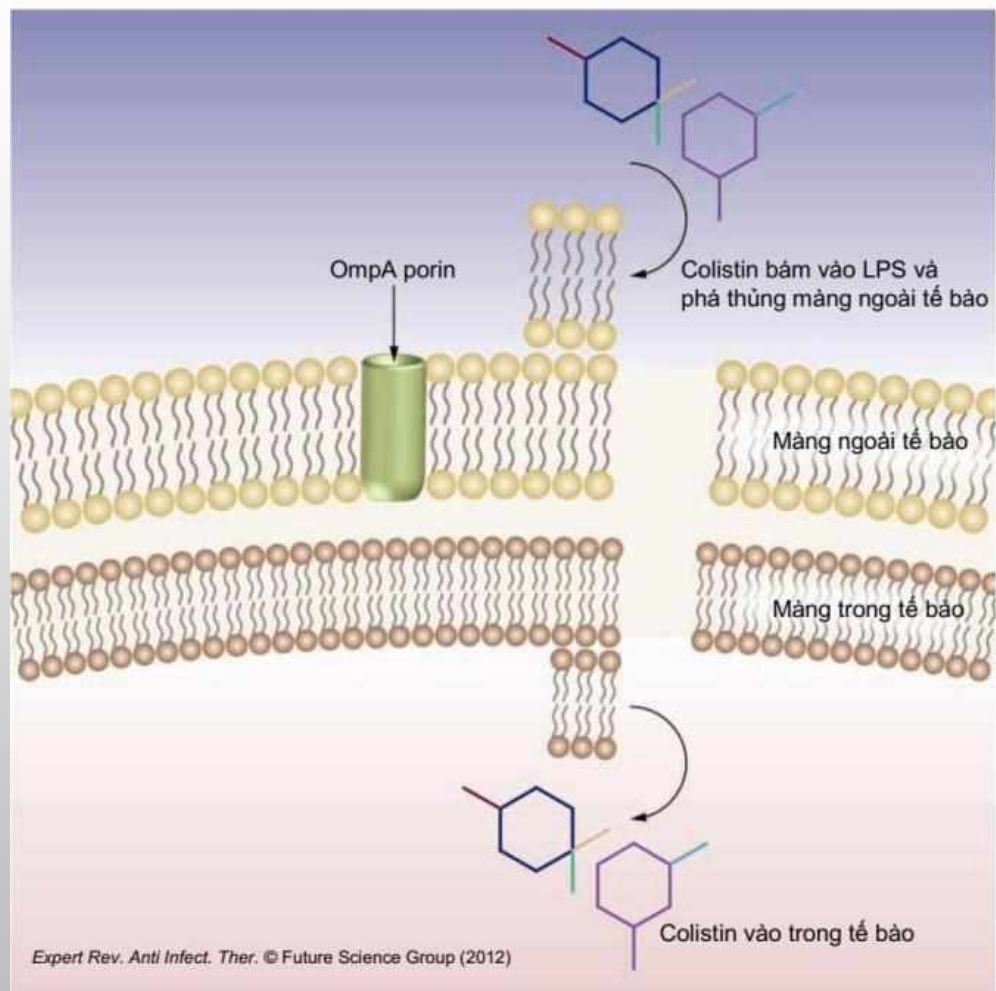
Trong đó:

$$+ \text{FIC}_{\text{Colistin}} = \text{MIC}_{\text{colistin khi có meropenem}} / \text{MIC}_{\text{chỉ colistin}}$$

$$+ \text{FIC}_{\text{meropenem}} = \text{MIC}_{\text{meropenem khi có colistin}} / \text{MIC}_{\text{chỉ meropenem}}$$

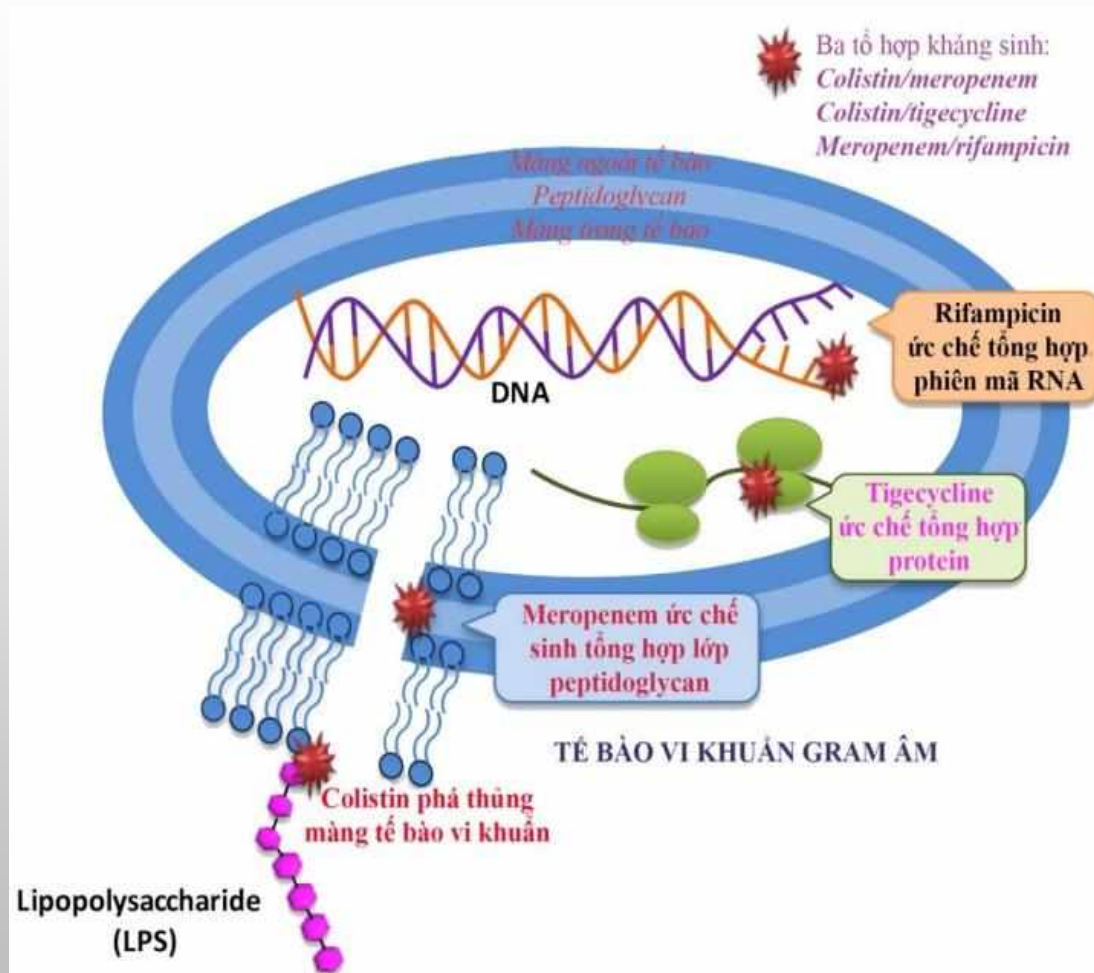
Kết luận:

<b>FIC index <math>\leq 0,5</math></b>	meropenem và colistin tác dụng hiệp đồng (synergism)
<b>FIC index từ 0,5 tới <math>\leq 1</math></b>	meropenem và colistin có tác dụng cộng lực (addictive)
<b>FIC index từ <math>&gt;1</math> tới <math>&lt;4</math></b>	meropenem và colistin có tác dụng độc lập (independent)
<b>FIC index <math>\geq 4</math></b>	meropenem và colistin tác dụng đối kháng (antagonism)



**Hình 3. 25.** Phương thức hoạt động kháng khuẩn của polymyxin chống lại màng tế bào vi khuẩn Gram âm; LPS: Lipopolysaccharide.

## GIẢI THUYẾT VỀ CƠ CHẾ HOẠT ĐỘNG CỦA CÁC PHỐI HỢP KHÁNG SINH



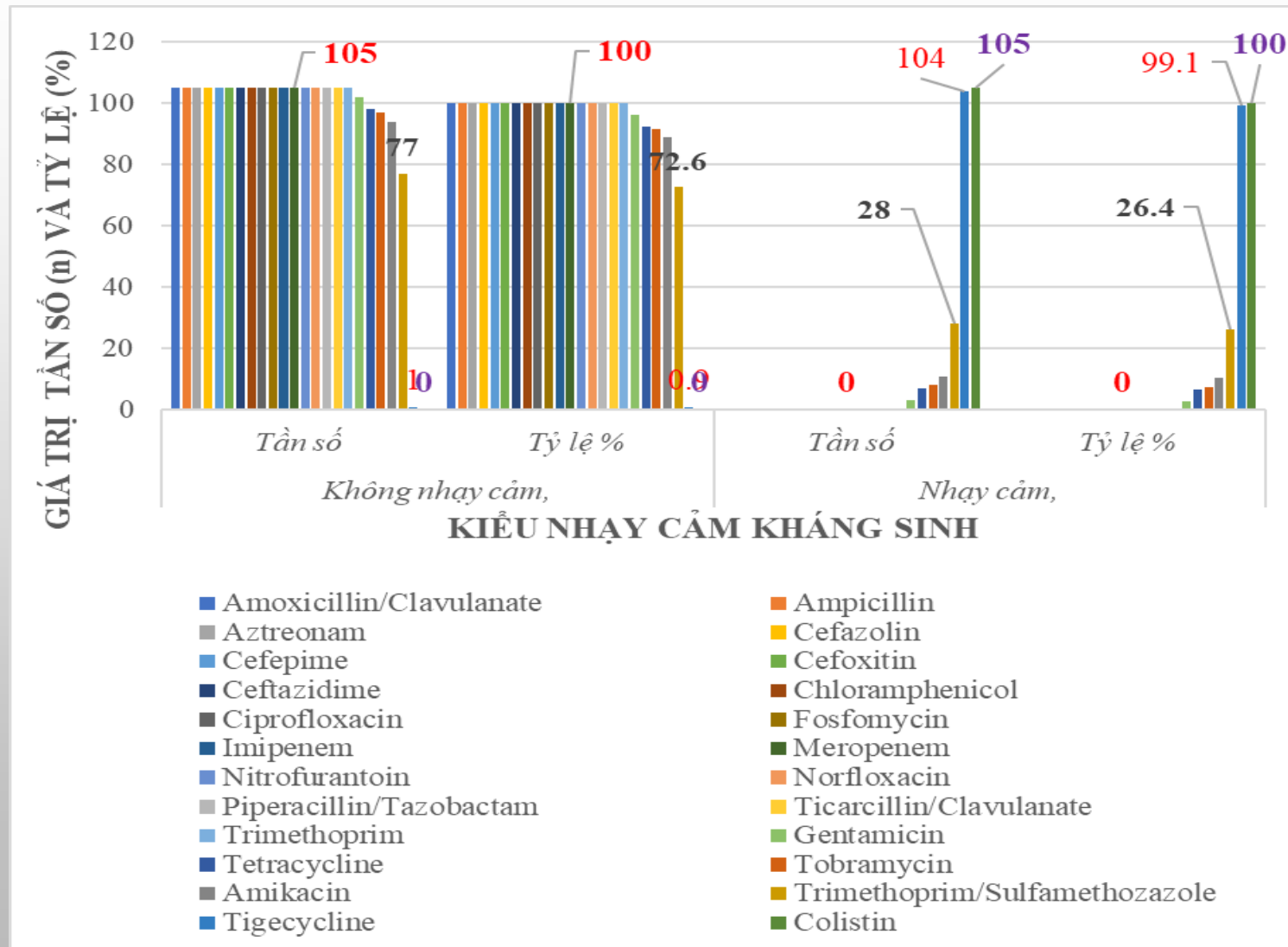
**Hình 3. 26.** Sơ đồ minh họa cơ chế hoạt động của các kháng sinh trong các tổ hợp phối hợp kháng sinh

### 3.3. PHƯƠNG PHÁP SINH HỌC PHÂN TỬ

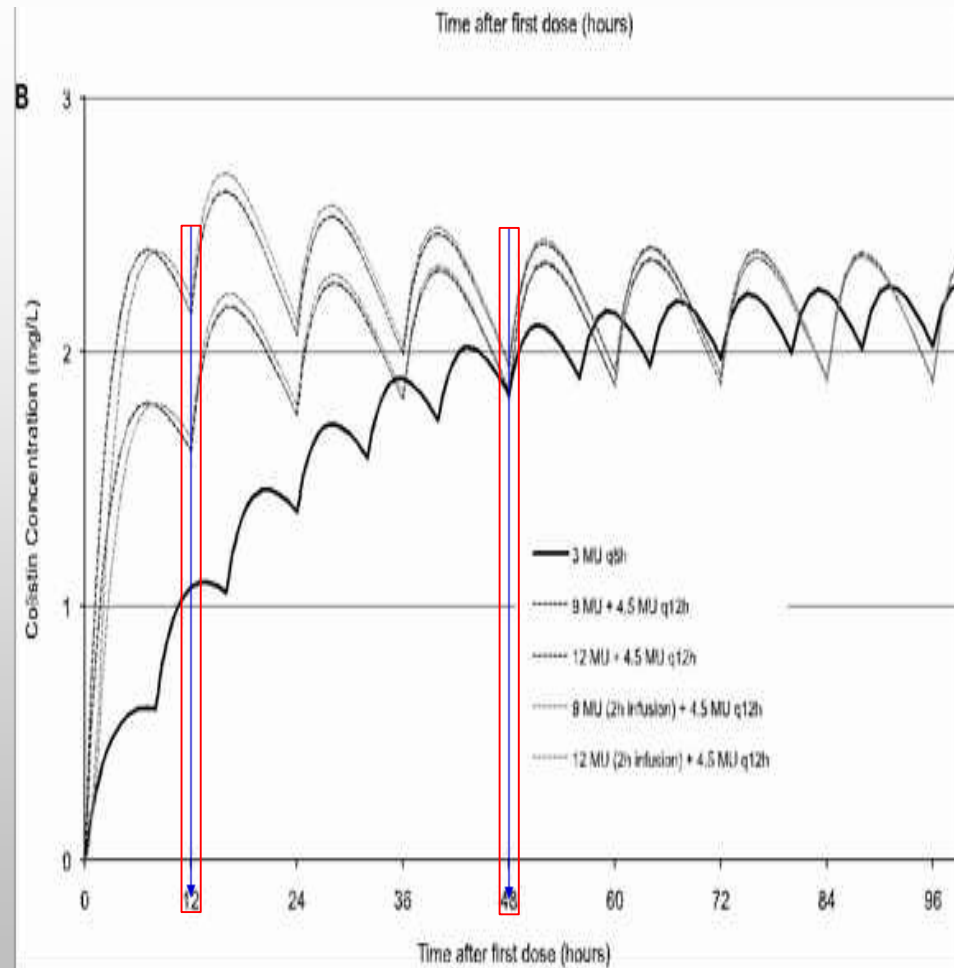
- H. Segal, S. Garry, and B. G. Elisha, "Is IS ABA-1 customized for Acinetobacter?," *FEMS microbiology letters*, vol. 243, pp. 425-429, 2005. → [ISAba1](#)
- C. f. D. Control and Prevention, "Multiplex real-time PCR detection of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) and New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1) genes," *Atlanta*, vol. 500, pp. 6-7, 2011. → [KPC và NDM-1](#)
- Tuan Anh, N., Nga, T. V., Tuan, H. M., Tuan, N. S., Chau, N. V., Baker, S., & Duong, H. H. (2016). The molecular epidemiology and antimicrobial resistance phenotypes of acinetobacter baumannii isolated from patients in three hospitals in Southern Vietnam. *Journal of medical microbiology*, 66. → [Các OXA](#)

# 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

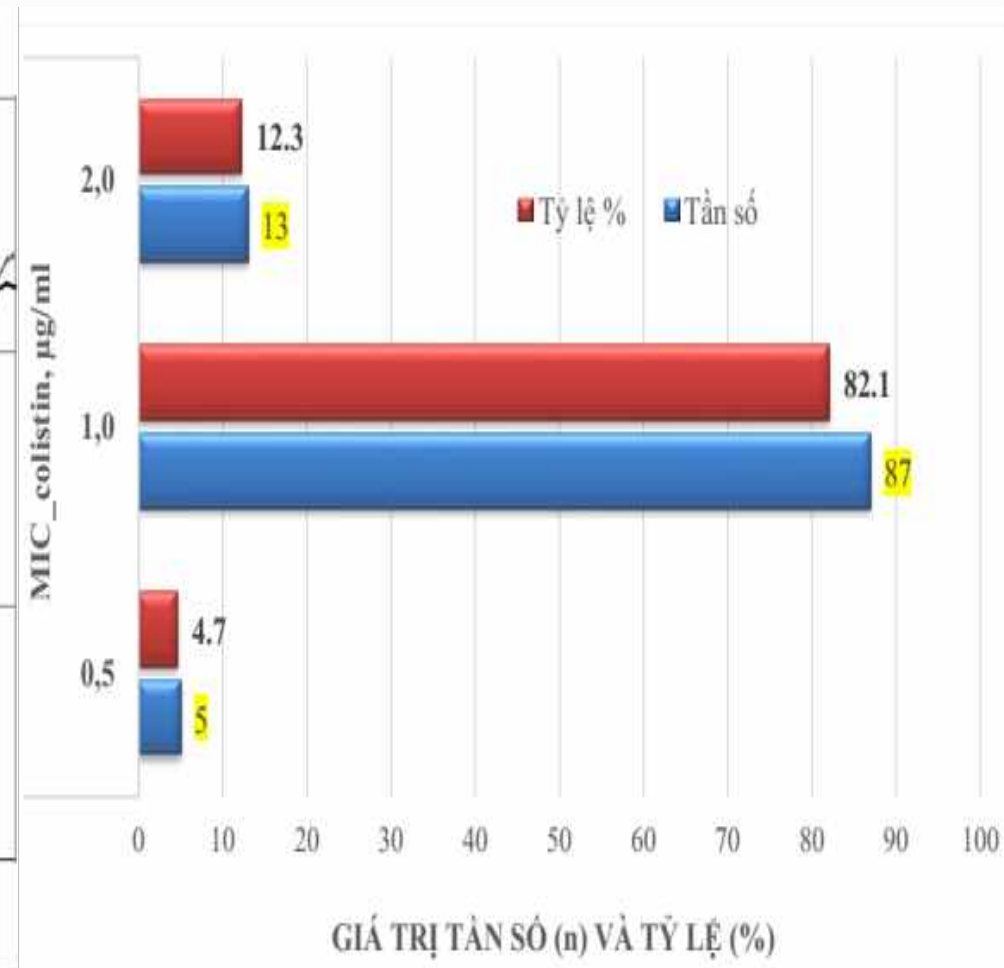
# 4.1. ĐẶC ĐIỂM KHÁNG KHÁNG SINH CỦA *A. BAUMANNII* ĐỀ KHÁNG CARBAPENEM



## 4.2. MIC CỦA COLISTIN, MEROPENEM, RIFAMPICIN, TIGECYCLINE VỚI *A. BAUMANNII* ĐỀ KHÁNG CARBAPENEM

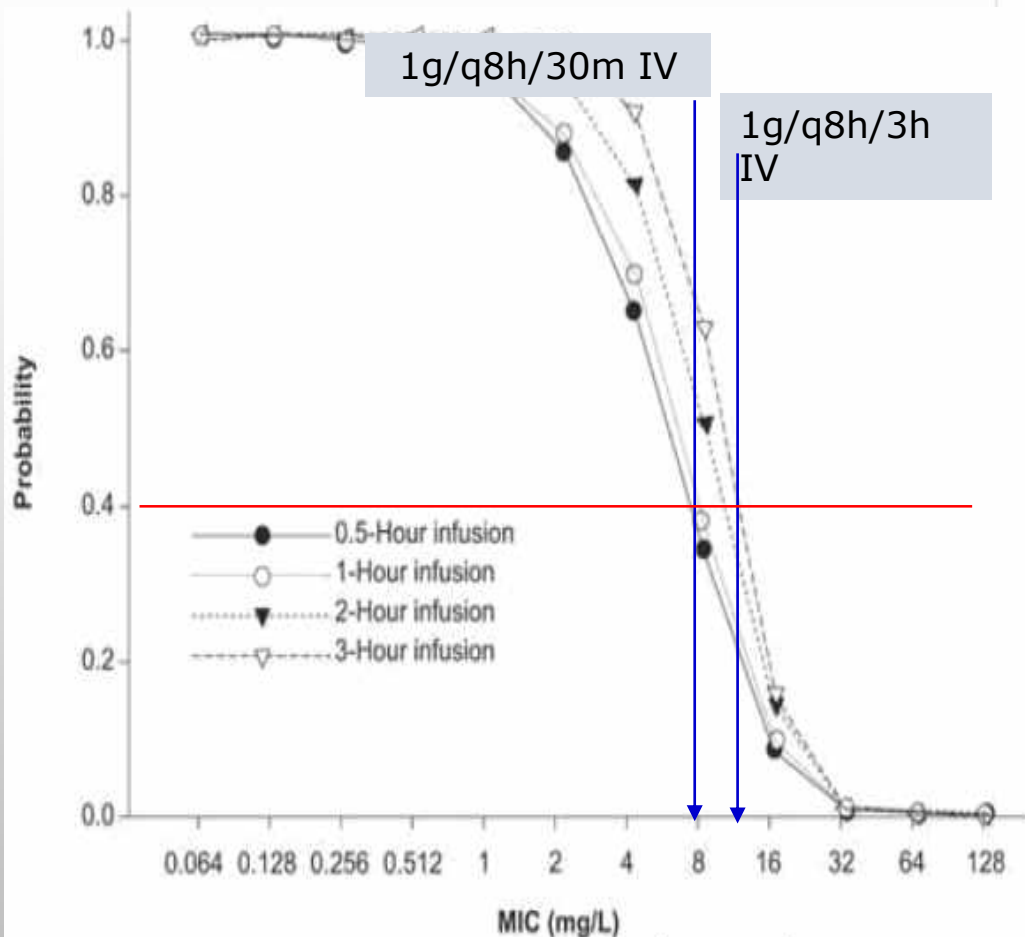


Hình 3. 1. Biểu đồ nồng độ colistin đạt trong dịch cơ thể với liều sử dụng khác nhau

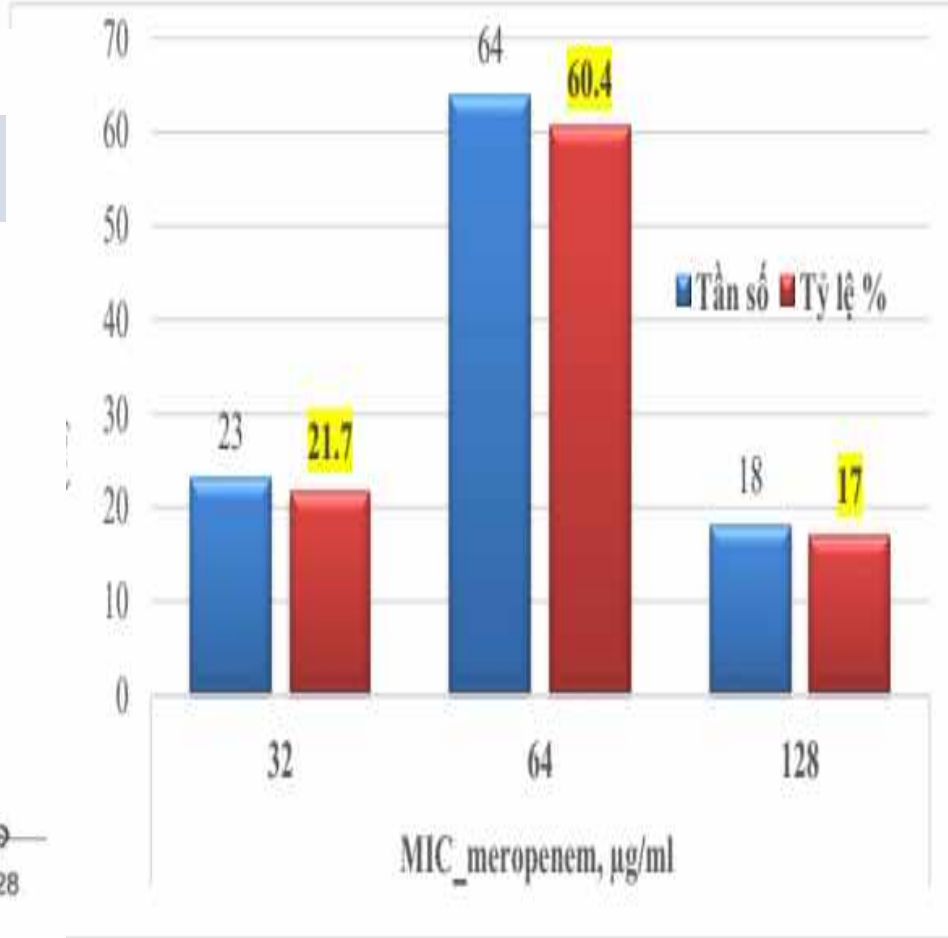


Biểu đồ 3. 2. Biểu đồ phân bố nồng độ ức chế tối thiểu của colistin đối với *Acinetobacter baumannii* đề kháng carbapenem

# 4.2. MIC CỦA COLISTIN, MEROPENEM, RIFAMPICIN, TIGECYCLINE VỚI A. BAUMANNII ĐỀ KHÁNG CARBAPENEM



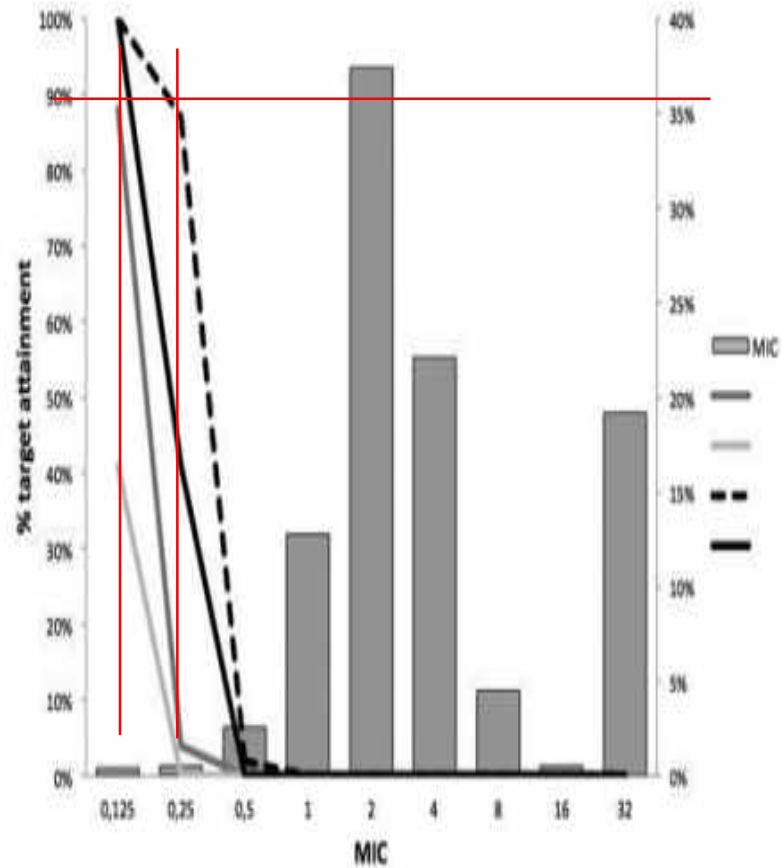
**Hình 3. 2.** Khả năng đạt được mục tiêu diệt khuẩn (nồng độ thuốc tự do cao hơn MIC trong 40% khoảng thời gian dùng thuốc ở các MIC cụ thể, sau khi tiêm 1g meropenem mỗi 8 giờ với thời gian truyền là 0,5 giờ; 1 giờ; 2 giờ và 3 giờ)



**Biểu đồ 3. 3.** Biểu đồ phân bố nồng độ ức chế tối thiểu của meropenem đối với *Acinetobacter baumannii* đề kháng carbapenem

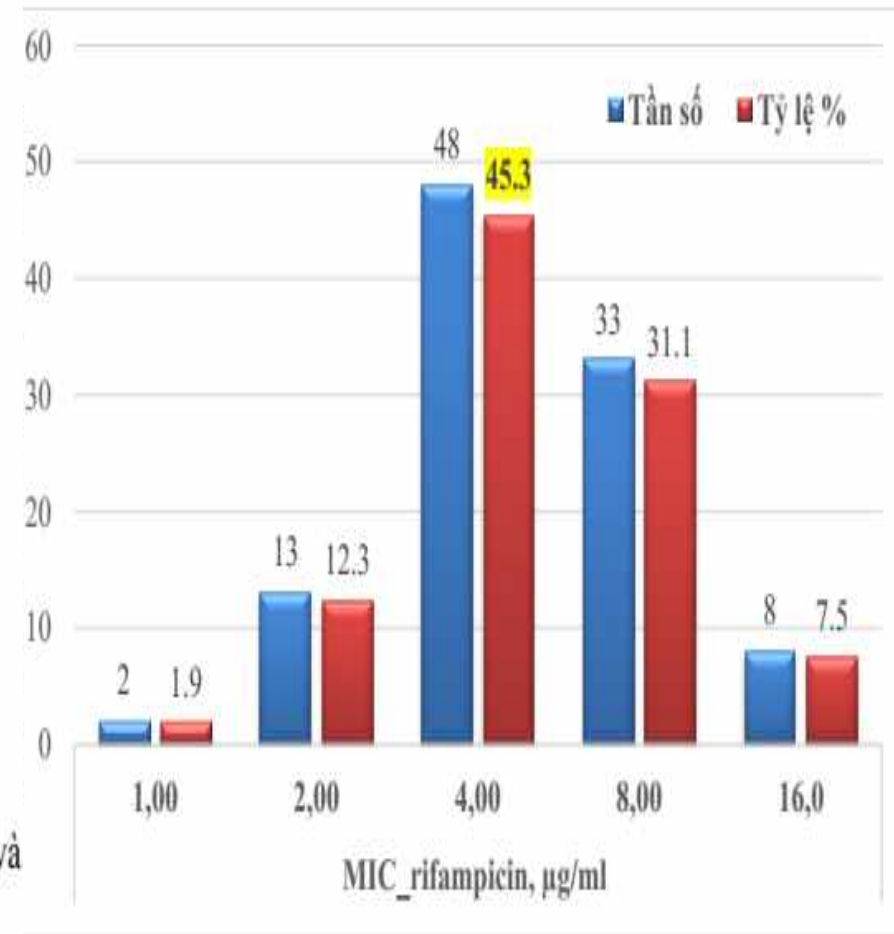


## 4.2. MIC CỦA COLISTIN, MEROPENEM, RIFAMPICIN, TIGECYCLINE VỚI A. BAUMANNII ĐỀ KHÁNG CARBAPENEM

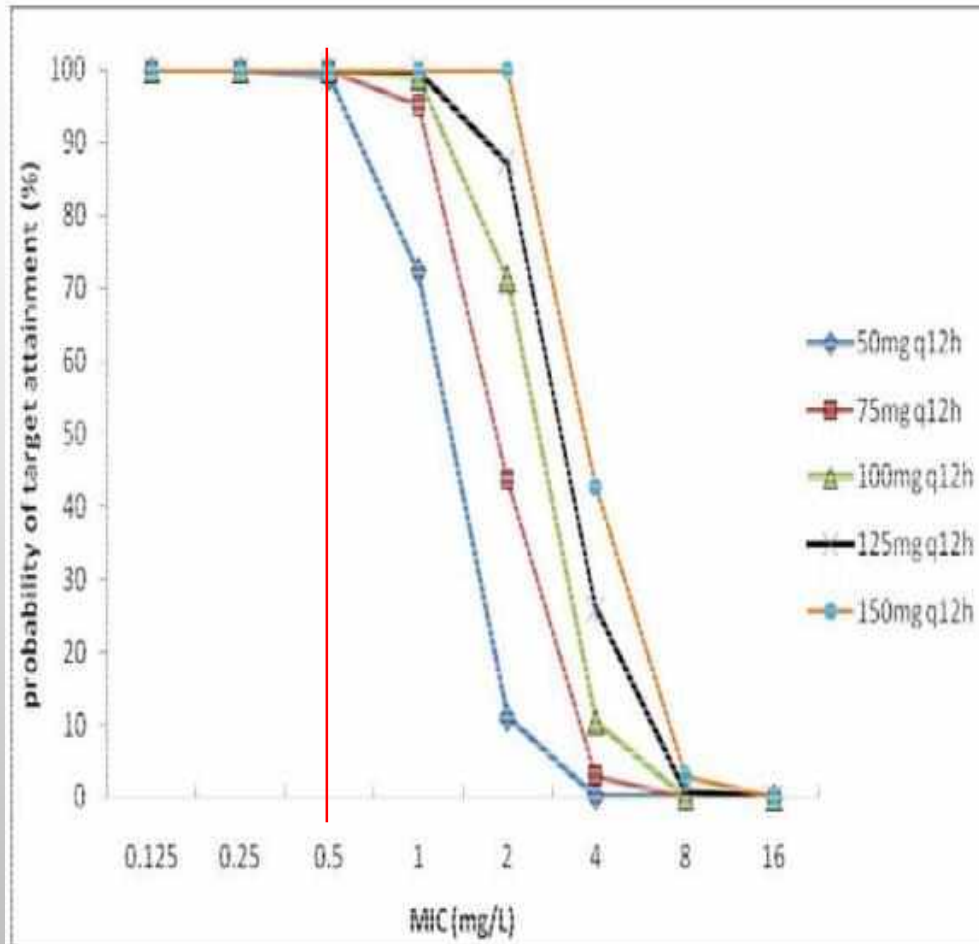


Hình 3. 3. Sự phân bố giá trị MIC của các chủng *A. baumannii* với rifampicin và giá trị MIC so với % đạt được mục tiêu pK/pD

Biểu đồ 3. 4. Biểu đồ phân bố nồng độ ức chế tối thiểu của rifampicin đối với *Acinetobacter baumannii* đề kháng carbapenem

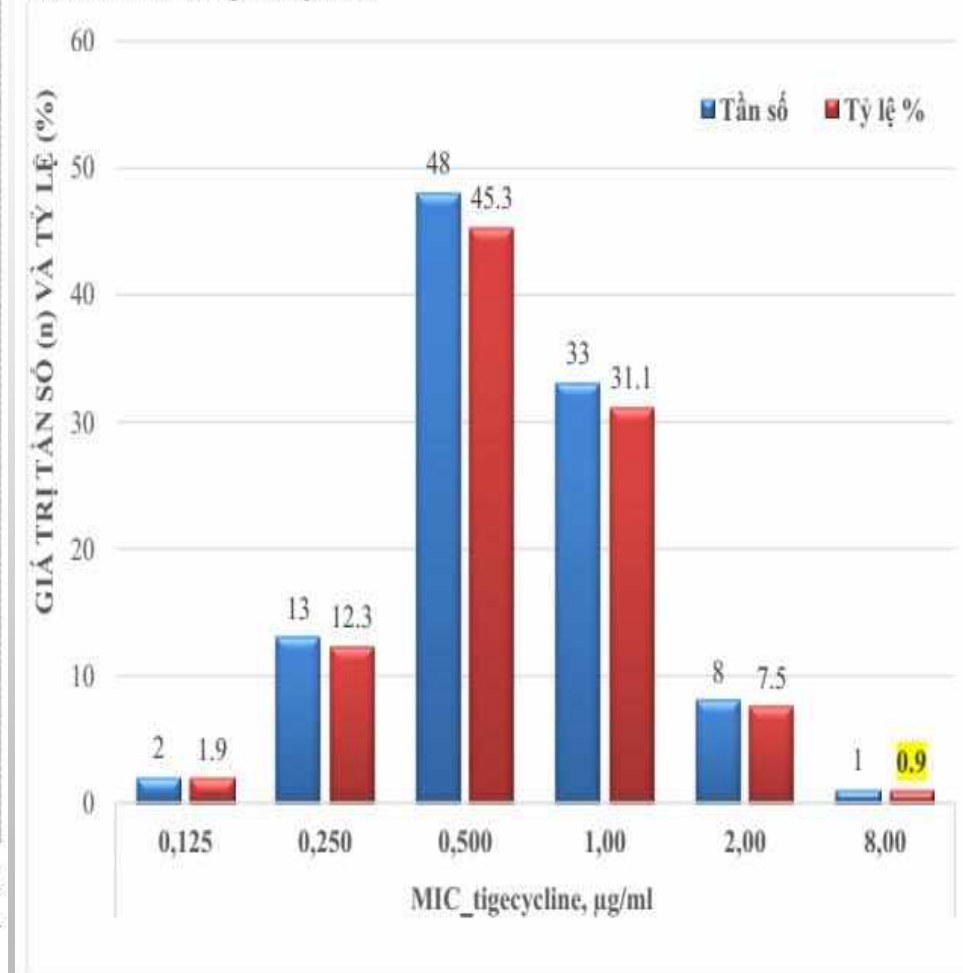


## 4.2. MIC CỦA COLISTIN, MEROPENEM, RIFAMPICIN, TIGECYCLINE VỚI A. BAUMANNII ĐỀ KHÁNG CARBAPENEM



**Hình 3. 4.** Xác suất đạt được mục tiêu của 10 ngàn bệnh nhân mô phỏng được trị liệu với tigecycline ở các liều lượng khác nhau. Mục tiêu được chọn là  $fAUC_{0-24h}/MIC > 0,9$ .

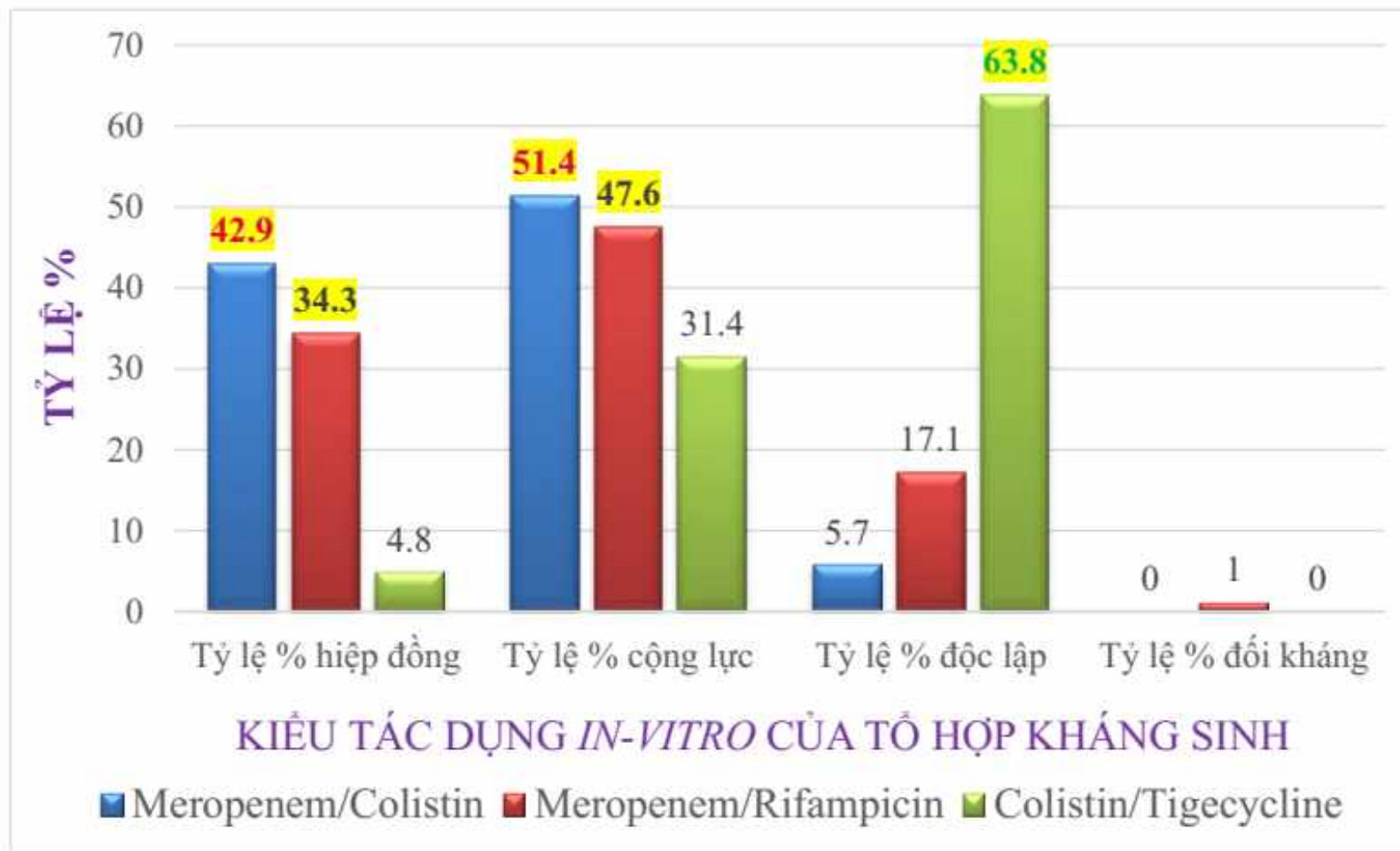
**Biểu đồ 3. 5.** Biểu đồ phân bố nồng độ ức chế tối thiểu của tigecycline đối với *Acinetobacter baumannii* đề kháng carbapenem



## 4.3. TÁC DỤNG DIỆT KHUẨN *IN-VITRO* CỦA CÁC PHỐI HỢP KHÁNG SINH LÊN *ACINETOBACTER BAUMANNII*

### 4.3.1. CÁC KIỂU TÁC DỤNG IN-VITRO KHI PHỐI HỢP KHÁNG SINH LÊN *A. BAUMANNII* ĐỀ KHÁNG CARBAPENEM

**Biểu đồ 3. 7.** Tỷ lệ % các kiểu tác dụng khi phối hợp meropenem/colistin, meropenem/rifampicin, colistin/tigecycline lên *A. baumannii* kháng carbapenem



### 4.3.2. TÁC DỤNG CỦA COLISTIN, RIFAMPICIN Ở NỒNG ĐỘ THẤP HƠN MIC CHUYỂN *A. BAUMANNII* TỪ KHÔNG NHẠY MEROPENEM THÀNH NHẠY

**Bảng 3. 37.** Phân bố các chủng *A. baumannii* chuyển từ không nhạy meropenem thành nhạy khi có sự phối hợp với colistin ở các mức nồng độ thấp hơn MIC

Nồng độ colistin ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC meropenem $\leq 8 \mu\text{g/ml}$	
	Tần số	Tỷ lệ, %
0,125	0	0
0,5	3	2,9
1	34	32,4
2	101	96,2

### 4.3.3. TÁC DỤNG CỦA COLISTIN, RIFAMPICIN Ở NỒNG ĐỘ THẤP HƠN MIC CHUYỂN *A. BAUMANNII* TỪ KHÔNG NHẠY MEROPENEM THÀNH NHẠY

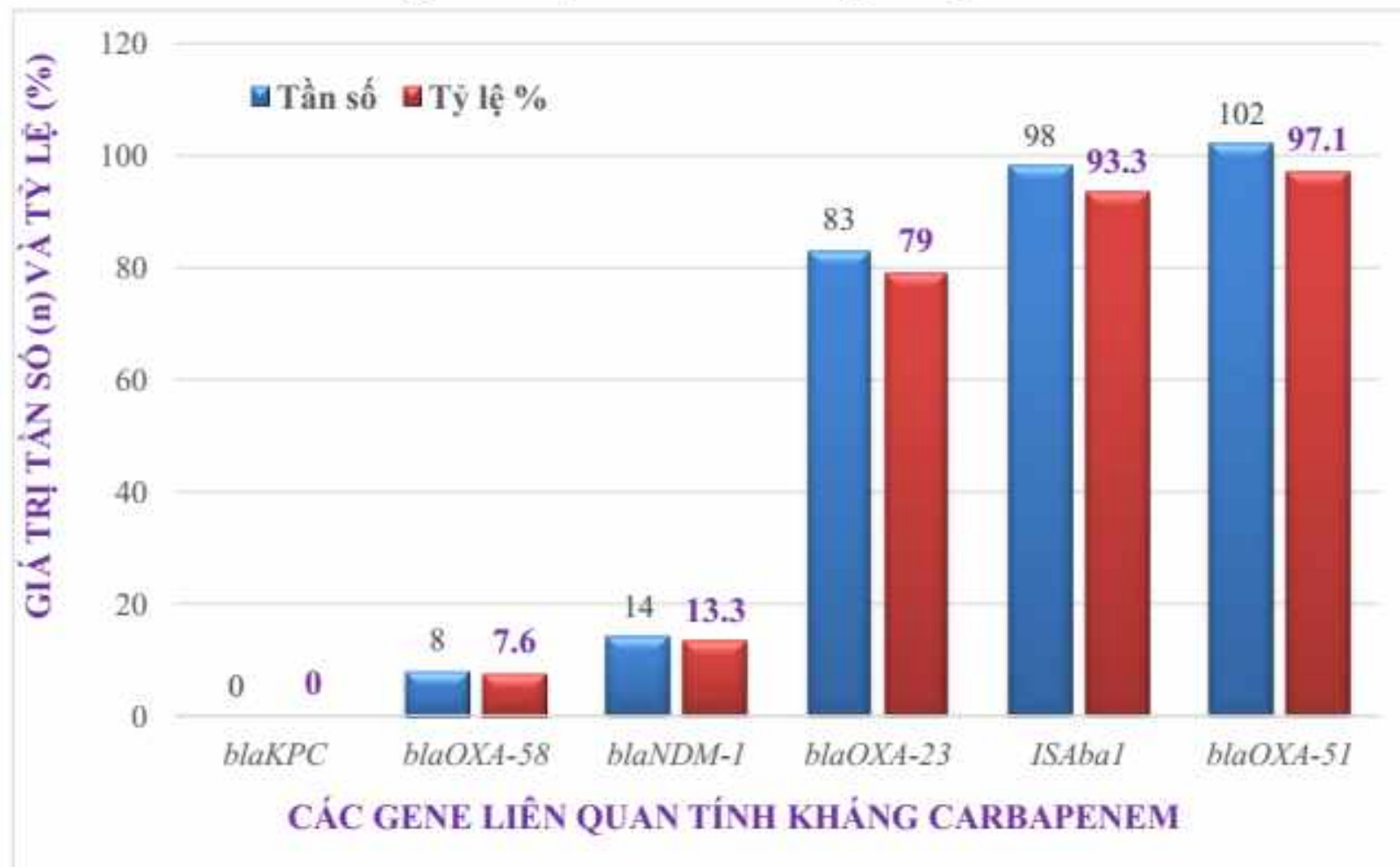
**Bảng 3. 38.** Phân bố các chủng *A. baumannii* chuyển từ không nhạy meropenem thành nhạy khi có sự phối hợp với rifampicin ở các mức nồng độ thấp hơn MIC

Nồng độ rifampicin ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC_meropenem $\leq 8 \mu\text{g/ml}$	
	Tần số	Tỷ lệ, %
0,25	0	0
0,5	2	1.9
1,0	4	3.8
2,0	64	61
4,0	98	93.3

#### 4.4. TỶ LỆ CÁC GEN LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH KHÁNG CARBAPENEM Ở *ACINETOBACTER BAUMANNII* ĐỀ KHÁNG CARBAPENEM

#### 4.4.1. TỶ LỆ $BLA_{NDM-1}$ , $ISABA1$ , $BLA_{OXA}$ LIÊN QUAN ĐẾN KHÁNG CARBAPENEM Ở *A. BAUMANNII* ĐỀ KHÁNG CARBAPENEM

**Biểu đồ 3. 6.** Phân bố các gene liên quan đến tính kháng carbapenem ở *A. baumannii*





4.4.2. PHÂN BỐ  
 CỦA  $BLA_{NDM-1}$ ,  
 $ISABA1$ ,  $BLA_{OXA}$   
 LIÊN QUAN ĐẾN  
 KHÁNG  
 CARBAPENEM Ở *A.*  
*BAUMANNII* ĐỀ  
 KHÁNG  
 CARBAPENEM

**Bảng 3. 8.** Phân bố số gene trong cùng 1 chủng ở *A. baumannii* kháng carbapenem

Sự tích lũy gene liên quan đến tính kháng carbapenem	Tần số	Tỷ lệ %
Một gene	3	2,9
Hai gene	13	12,4
<b>Ba gene</b>	<b>84</b>	<b>80</b>
Ba gene có bao gồm <i>ISAbal</i>	82	97,6
Ba gene có bao gồm <i>bla<sub>OXA-23</sub></i>	76	90,5
Ba gene ( <i>ISAbal</i> + <i>bla<sub>OXA-23</sub></i> + <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> )	74	88,1
Bốn gene (đều có chứa <i>ISAbal</i> )	5	4,8
Bốn gene ( <i>ISAbal</i> + <i>bla<sub>OXA-23</sub></i> + <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> + <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> )	2	40
Bốn gene ( <i>ISAbal</i> + <i>bla<sub>OXA-23</sub></i> + <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> + <i>bla<sub>OXA-58</sub></i> )	1	20
Bốn gene ( <i>ISAbal</i> + <i>bla<sub>OXA-58</sub></i> + <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> + <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> )	2	40

## 4.5. MỐI LIÊN QUAN GIỮA TỶ LỆ CÁC PHỐI HỢP KHÁNG SINH *IN-VITRO* VỚI CÁC GEN MÃ HÓA CARBAPENEMASE

## 4.5.1. SO SÁNH TÁC DỤNG HIỆP ĐỒNG VÀ CỘNG LỰC CỦA 3 TỔ HỢP KHÁNG SINH ĐỐI VỚI *A. BAUMANNII*

**Bảng 3. 39.** Tóm tắt kiểm định giả thuyết về tác dụng hiệp đồng và cộng lực của 3 tổ hợp kháng sinh đối với *Acinetobacter baumannii*

STT	Giả thuyết	Phép kiểm	<i>p</i>	Quyết định
01	Việc phân phối các giá trị khác nhau trên tổ hợp meropenem/colistin và meropenem/rifampicin đều tương đương nhau	McNemar test	0,011	Bác bỏ giả thuyết
02	Việc phân phối các giá trị khác nhau trên tổ hợp meropenem/colistin và tigecycline/colistin đều tương đương nhau	McNemar test	0,001	Bác bỏ giả thuyết
03	Việc phân phối các giá trị khác nhau trên tổ hợp meropenem/rifampicin và tigecycline/colistin đều tương đương nhau	McNemar test	0,001	Bác bỏ giả thuyết

## 4.5.2. MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA CÁC GEN LIÊN QUAN ĐẾN KHÁNG CARBAPENEM VÀ TÁC DỤNG HIỆP ĐỒNG VÀ CỘNG LỰC CỦA MỖI TỔ HỢP KHÁNG SINH LÊN *A. BAUMANNII*

**Bảng 3. 40.** Mối tương quan giữa có gene *bla*<sub>OXA-23</sub> và tác dụng hiệp đồng, cộng lực của tổ hợp tigecycline/colistin

		Gene mã hóa OXA-23		Tổng	
		Có	Không		
Hiệu quả của Tg/Co	Có	Số mẫu	26	12	38
		% với Gene	31,3%	54,5%	36,2%
Tg/Co	Không	Số mẫu	57	10	67
		% với Gene	68,7%	45,5%	63,8%
Tổng		Số mẫu	83	22	105
		% với Gene	100%	100%	100%

- *A. baumannii* mang gen mã hóa OXA-23 giảm 62% (tác dụng) so với khi thử nghiệm tổ hợp kháng sinh này với chủng *A. baumannii* không mang gen mã hóa OXA-23, với khoảng tin cậy 95% dao động từ 1% đến 85%.

# 5. KẾT LUẬN

- ❖ *A. baumannii* kháng: 100% với  $\beta$ -lactam và gentamicin; 7,5% với tobramycin và 10,4% với amikacin.
- ❖ *A. baumannii* còn nhạy 26,4% với Bactrim.
- ❖ Hai kháng sinh còn nhạy cảm với tỷ lệ rất cao, tigecycline (tỷ lệ nhạy cảm là 99,1%) và colistin (tỷ lệ nhạy cảm là 100%).

- ❖ 80% *A. baumannii* đề kháng carbapenem mang 3 nhóm gen liên quan đến tính kháng carbapenem.
- ❖ Trong các chủng mang 3 nhóm gen, 97,6% các chủng đều mang trình tự ISAba1.
- ❖ OXA-51 chiếm 97,1%; OXA-23 với 79% và OXA-58 là 7,6%.
- ❖ NDM-1 với tỷ lệ là 13,3% và không ghi nhận có KPC.

- ❖ Meropenem/colistin có tác dụng hiệp đồng và cộng lực với tỷ lệ cao nhất, là 94,3%;
- ❖ Meropenem/rifampicin có tác dụng hiệp đồng và cộng lực với tỷ lệ cao thứ hai, là 81,9%;
- ❖ Tigecycline/colistin chỉ cho tác dụng hiệp đồng và cộng lực với tỷ lệ là 36,2%.



❖ Các chủng *A. baumannii* đề kháng carbapenem mang gen mã hóa OXA-23 sẽ có tác dụng hiệp đồng và cộng lực thấp hơn so với các chủng *A. baumannii* không mang gen mã hóa OXA-23 KHI ÁP DỤNG TỔ HỢP TIGECYCLINE/COLISTIN.

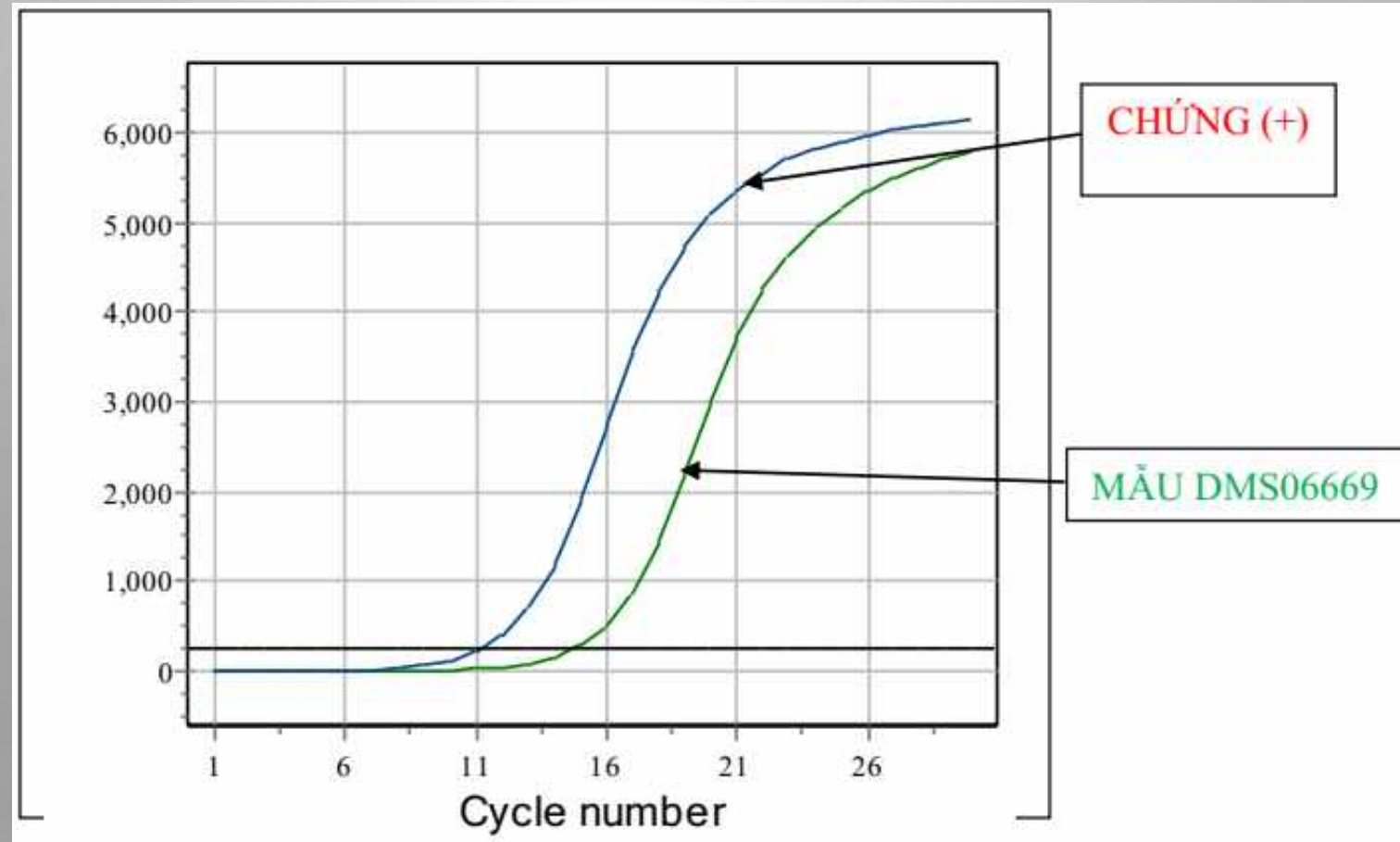
**CHÂN THÀNH CẢM ƠN**

**QUÝ ĐỒNG NGHIỆP ĐÃ LẮNG NGHE!**

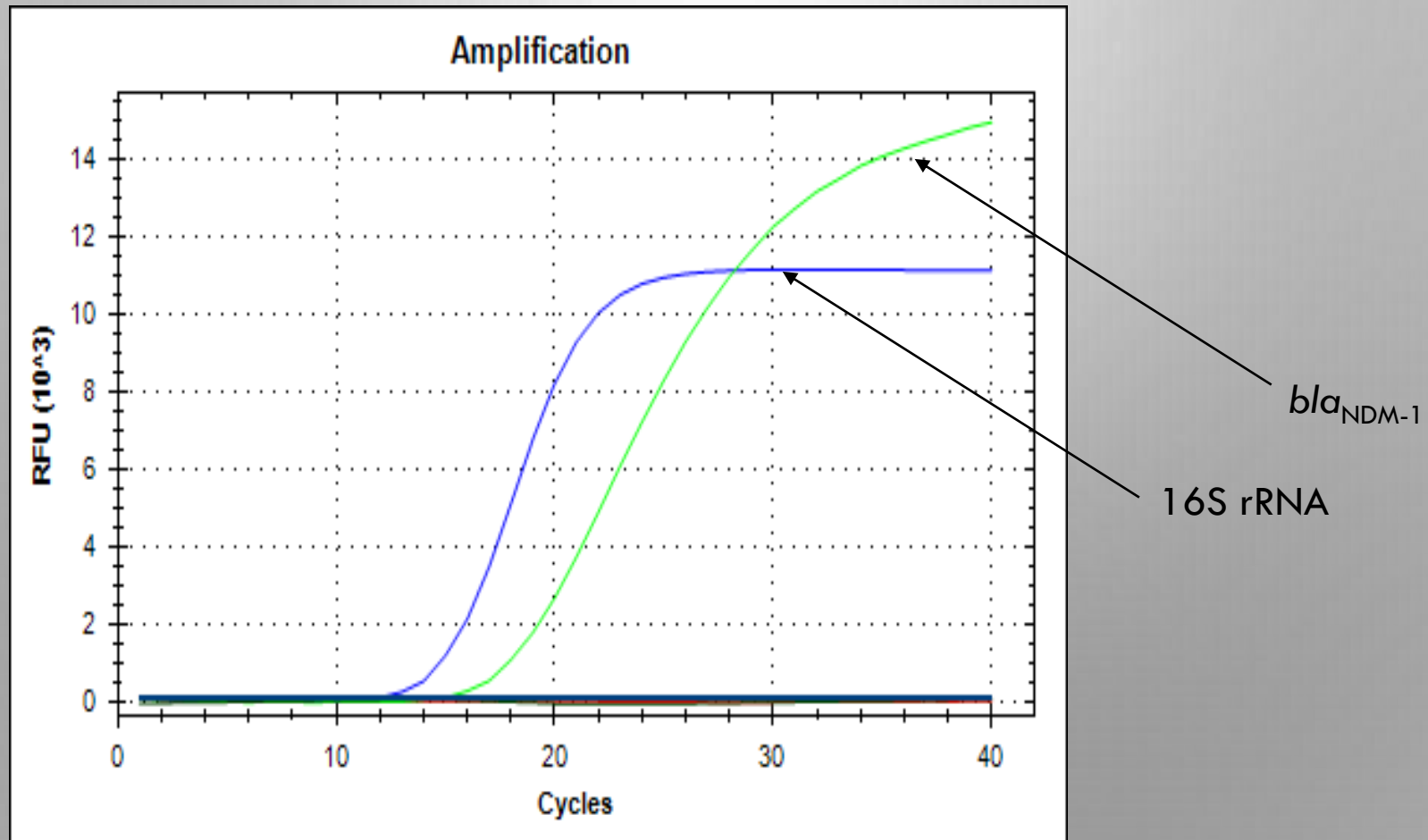
## ĐẶC ĐIỂM GENE MÃ HÓA CARBAPENEMASE 2 CHỦNG ĐẶC TRƯNG



## ĐẶC ĐIỂM GENE MÃ HÓA ISABA1

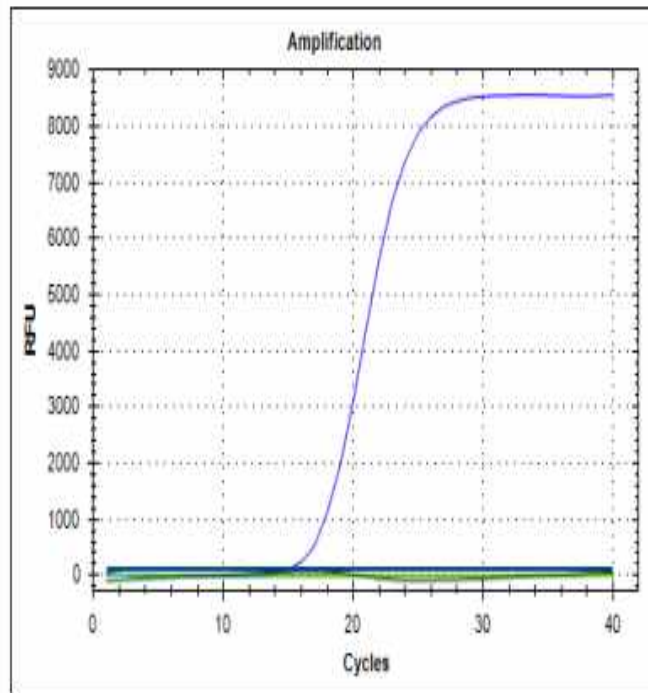


## REALTIME PCR PHÁT HIỆN GENE MÃ HÓA NDM-1

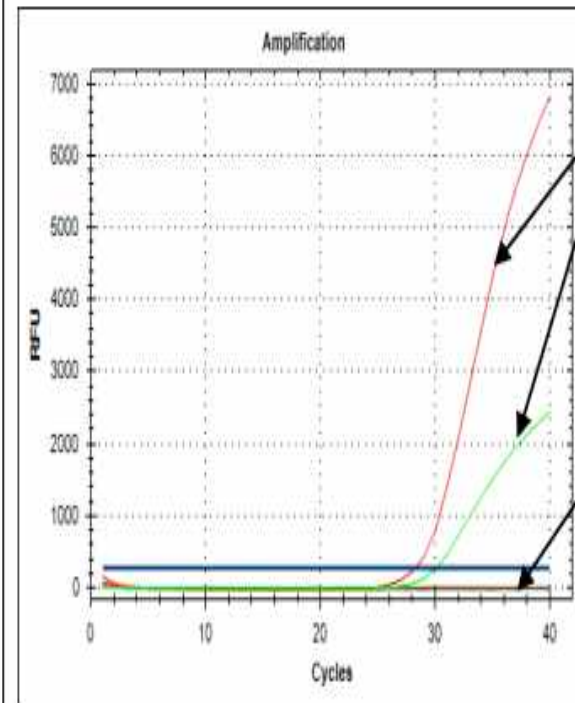


# REALTIME PCR PHÁT HIỆN GENE MÃ HÓA NDM-1

## MÁU ÂM



## CHỨNG DƯƠNG VÀ ÂM



Chứng dương  
KPC/NDM1

CHỨNG ÂM