**TÓM TẮT THÔNG TIN VỀ LUẬN ÁN**

Tên đề tài luận án: Nghiên cứu đặc điểm kháng thuốc, kiểu gen, sự truyền plasmid mang *bla*NDM của các chủng vi khuẩn đường ruột Gram âm lâm sàng tại TP. HCM 2010-2017.

Ngành: Di truyền.

Mã số ngành: 62420121.

Họ tên nghiên cứu sinh: Lê Hà Tầm Dương.

Khóa đào tạo: 2014.

Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. Cao Thị Bảo Vân.

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQG.HCM.

**1. TÓM TẮT NỘI DUNG LUẬN ÁN**

Vi khuẩn (VK) kháng kháng sinh đặc biệt đa kháng đồng thời kháng carbapenem - nguồn cứu cánh trong điều trị nhiễm đa kháng khuẩn - đã và đang là vấn đề cấp bách báo động toàn cầu. Một trong những cơ chế giúp vi khuẩn kháng carbapenem là sự hiện diện của các gen mã hóa carbapenemase trong đó *bla*NDM, gen mã hóa New Delhi Metallo beta-lactamase (NDM), là carbapenemase được phát hiện gần đây nhất và là một trong những enzyme được quan tâm hàng đầu do chúng có thể lan truyền qua trung gian plasmid giữa các VK nhờ cơ chế tiếp hợp. Đặc biệt, VK mang *bla*NDM thường đa kháng hoặc toàn kháng do chúng có khả năng tiếp nhận các gen kháng khác thông qua các yếu tố di truyền động, dẫn đến sự biến động và đa dạng di truyền vùng quanh gen *bla*NDM. Các đăc điểm trên có thể đã giúp *bla*NDM nhanh chóng lan rộng trên toàn thế giới. Đến nay có ít nhất 24 biến thể NDM lưu hành trên khoảng 200 loại plasmid ở các dòng ST khác nhau thuộc 11 họ VK. Mặc dù NDM đã tồn tại phổ biến tại nước ta và gây hậu quả nghiêm trọng trong lâm sàng nhưng các kết quả phân tích di truyền VK mang *bla*NDM ở nước ta vẫn còn khiêm tốn. Do đó, mục tiêu của luận án này là nghiên cứu đặc điểm kháng thuốc, kiểu gen, các yếu tố góp phần lan truyền plasmid mang gen *bla*NDM ở nước ta, trả lời cho các câu hỏi nghiên cứu: 1) Tính đa dạng di truyền vùng trình tự xung quanh gen *bla*NDM ở nước ta có vai trò như thế nào trong việc lan truyền gen kháng? 2) Có sự biến động di truyền của vùng gen *bla*NDM đi kèm với tần suất lan truyền của chúng theo thời gian không? 3) Có hay không dòng ST phổ biến ở mỗi loài VK mang *bla*NDM? Việc lan truyền *bla*NDM có dễ dàng giữa các loài khác nhau?

Để đạt được các mục tiêu trên, chúng tôi thực hiện các thí nghiệm trên nhóm VK đường ruột Gram âm lâm sàng kháng carbapenem, gốm: Phân lập, xác định kiểu hình kháng KS, sàng lọc chủng mang gen *bla*NDM; Nghiên cứu các đặc trưng di truyền của các chủng đại diện bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới và sử dụng các công cụ tin sinh học để: (i) Xác định các dạng biến thể NDM; (ii) Xác định nhóm plasmid mang gen *bla*NDM; (iii) Phân tích đặc điểm cấu trúc, thành phần của vùng gen *bla*NDM và (iv) Xác định dòng ST của các chủng và phân tích đặc điểm chuyển gen *bla*NDM qua cơ chế tiếp hợp.

Tổng cộng 142 chủng vi khuẩn Gram âm kháng carbapenem đã được phân lập tại 4 bệnh viện ở TPHCM trong thời gian 2010-2017, nhiều nhất là nhóm chủng *K. pneumoniae* (75%). Có 64/142 (45%) chủng cho kết quả dương tính *bla*NDM. Tỷ lệ chủng mang NDM tăng mạnh kể từ 2015 (từ 50% lên 74%). Tất cả các chủng thu nhận đều cho kiểu hình kháng/trung gian với hầu hết các loại kháng sinh được sử dụng trong điều trị hiện nay. Có 2 biến thể NDM ở các chủng nghiên cứu: NDM-1 (8/17 chủng) và NDM-4 (9/17 chủng), trong đó NDM-4 dần thay thế NDM-1 kể từ 2015, có hoạt tính cao hơn NDM-1. Bên cạnh đó, chúng tôi ghi nhận 6 nhóm plasmid mang *bla*NDM, nhiều nhất là IncF (11/17) (gồm IncFII(Yp), IncFII(K) và IncFIA), các nhóm còn lại có IncC, IncX3 và IncHI2. Ngoài ra, các kết quả thu được cũng trả lời cho các câu hỏi nghiên cứu:

1) Tính đa dạng di truyền cấu trúc vùng gen *bla*NDM đã góp phần giải thích cho khả năng lan truyền nhanh rộng gen kháng *bla*NDM. Có ít nhất bốn phần tử IS khác nhau liên quan đến việc chuyển vị *bla*NDM cũng như các gen kháng kháng sinh khác. Các phần tử chuyển vị và các loại plasmid tương ứng của chúng là IS*CR21*/IS*3000* và/hoặc IS*26* trên IncX3 và IncFII(K); IS*CR21* trên IncFIIY(p); IS*CR1* và/ hoặc IS*26* trên IncC và IncFIA; và IS*3000* trên IncHI2. Đặc biệt ghi nhận số lượng gen kháng gia tăng đột biến ở những chủng mang *bla*NDM, sự đa dạng các nhân tố di truyền động xung quanh vùng gen *bla*NDM có thể đã góp phần sát nhập các gen kháng này. Ngoài ra, được ghi nhận ở hầu hết plasmid trong nghiên cứu, nhân tố chuyển vị Tn*5403,* một loại transposon nhóm Tn*3,* được chứng minh có mang enzyme có thể hỗ trợ plasmid không tiếp hợp trở nên tiếp hợp, qua đó làm gia tăng khả năng lan truyền giữa các vi khuẩn.

2) Trong nghiên cứu của chúng tôi, gen *bla*NDM-4 có thể đã liên kết với plasmid IncF chủ yếu ở *K. pneumoniae* các ST15 và ST16 xuất hiện từ 2014, 2015. NDM-4 là biến thể có kiểu hình kháng ưu thế hơn NDM-1, IncF là nhóm plasmid có khả năng tiếp hợp, ST15 và ST16 là các dòng ST quốc tế ưu thế đã được ghi nhận trên thế giới. Như vậy, đã có sự tiến hóa, thích nghi của dòng ST *K. pneumoniae* mang *bla*NDM thành dòng ưu thế trong nghiên cứu của chúng tôi.

3) Ở *E. coli*: Dòng ST405 lưu hành ở cả 3 Bệnh viện (BV) các năm 2015, 2017; dòng ST648 mang plasmid IncHI2, NDM-1 lưu hành ở BV ND2 năm 2015, 2017; dòng ST101 mang plasmid IncFIIY(p), NDM-1 lưu hành ở BV BD 2013, 2015 và dòng ST410 lưu hành ở BV ND1 năm 2017 là các dòng được ghi nhận. Ở *K. pneumoniae*: Dòng ST15 và ST16 mang plasmid IncF, NDM-4 là dòng chiếm ưu thế ở BV ND2 năm 2015, 2017, dòng ST983 là dòng được ghi nhận nhiều ở BV ND1 năm 2015. Về việc lan truyền *bla*NDM (qua cơ chế tiếp hợp), kết quả nghiên cứu cho thấy gen *bla*NDM có thể được truyền từ *K. pneumoniae/E. coli* sang *E. coli* (J53) với tần suất trung bình 10-4 – 10-6. Việc tiến hành tiếp hợp trên nhiều loài khác cũng như khảo sát các cơ chế chuyển gen khác ngoài tiếp hợp nên được thực hiện trong những nghiên cứu tiếp theo.

Ngoài ra, có hai kết quả của đề tài lần đầu tiên được ghi nhận trong y văn: 1) Trình tự chèn IS*Kpn19* và transposon Tn*6901* trong vùng trình tự gen *bla*NDM-1 ở chủng Res10BD-27; việc chèn thêm này kéo theo một loạt các gen kháng khác như *adh*, *glo*, *fgh* có thể đã góp phần gia tăng kiểu hình kháng của chủng này. 2) Hai kiểu trình tự ST mới, hoàn toàn chưa có trong ngân hàng dữ liệu kiểu trình tự thế giới: ST6280 ở chủng Res15ND1-30 và ST6270 ở chủng Res15ND2-20.

**2. NHỮNG KẾT QUẢ MỚI CỦA LUẬN ÁN**

Có ba cơ chế chính trong việc thu nhận gen mã hóa carbapenemase ở VK Gram âm là lan truyền theo dòng chủng (ST), lan truyền qua cơ chế tiếp hợp plasmid và qua các yếu tố di động cho phép thu nhận và/hoặc tách rời gen kháng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi ghi nhận tất cả các cơ chế trên ở nhóm chủng nghiên cứu và cả sự kết hợp của cả ba cơ chế trên cùng nhóm chủng *K. pneumoniae* ST16 mang plasmid IncFII(K). Kết quả nghiên cứu đã góp phần giải thích cơ chế lan truyền gen *bla*NDM qua đó lý giải tỷ lệ VK kháng carbapenem tăng nhanh. Biện pháp hiệu quả nhất hiện nay nhằm giảm tỷ lệ kháng theo chúng tôi vẫn là kiểm soát tốt nhiễm khuẩn bệnh viện, liên tục giám sát các dòng ST lưu hành tại các bệnh viện để kịp thời phát hiện dòng gây dich. Nếu được, cần sàng lọc, cách ly sớm và nghiêm ngặt bệnh nhân mang vi khuẩn kháng carbapenem đặc biệt bệnh nhân chuyển viện. Để làm được việc này, cần cấp thiết phát triển các kỹ thuật chẩn đoán nhanh để xác định kiểu hình kháng KS, dòng ST gây dịch (ví dụ ST16).

**3. CÁC ỨNG DỤNG/ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG THỰC TIỄN HAY NHỮNG VẤN ĐỀ CÒN BỎ NGỎ CẦN TIẾP TỤC NGHIÊN CỨU**

Trước tình hình VK đa kháng và kháng carbapenem không ngừng gia tăng, các kết quả của đề tài sẽ là nguồn dữ liệu cần thiết phục vụ cho công tác điều trị và quản lý lâm sàng. Để đạt hiệu quả hơn nữa, cần tăng cường hợp tác trao đổi giữa đội ngũ nghiên cứu và các y bác sĩ lâm sàng, tiếp tục thực hiện giám sát vi khuẩn kháng kháng sinh trên diện rộng với các nghiên cứu tiến cứu. Bên cạnh đó, cần tiếp tục thực hiện giải trình tự gen và phân tích đặc điểm di truyền phân tử gen kháng kháng sinh trên số lượng chủng lớn hơn, gồm cả mẫu thu thập từ môi trường, thú y và cộng đồng bên cạnh mẫu lâm sàng.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 16 tháng 6 năm 2023

|  |  |
| --- | --- |
| **TẬP THỂ CÁN BỘ HƯỚNG DẪN**  | **NGHIÊN CỨU SINH**  |

**XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO**

**HIỆU TRƯỞNG**

**THESIS INFORMATION**

**Thesis title:** Characterization of antibiotic resistance, sequence type, and *bla*NDM – harboring plasmid transmission of clinical Gram-negative *Enterobacteriaceae* in Ho Chi Minh City from 2010 to 2017.

**Speciality:** Genetics

**Code:** 62420121

**Name of PhD Student:** Le Ha Tam Duong

**Academic year:** 2014

**Supervisor:** Associate ProfessorCao Thi Bao Van

**At:** University of Science (VNUHCM)

1. **SUMMARY OF THESIS CONTENTS**

Multi-drug resistant bacteria especially those carrying genes resistant to carbapenem - one of the last-resort antibiotics - have become global public health threats. One important mechanism of carbapenem resistance is the hydrolysis of carbapenems by carbapenemases of which *bla*NDM, the gene encoding New Delhi Metallo beta-lactamase (NDM), is the most recently identified carbapenemases and is of primary interest as it is encoded mainly on plasmids and is highly transmissible. In particular, bacteria carrying *bla*NDM have often become resistant to all known antibiotics since they have the ability to receive other resistance genes through mobile genetic elements, leading to diversity of *bla*NDM genetic context.Since its discovery, bacteria carrying the *bla*NDM gene have rapidly spread around the world. To date, at least 24 NDM variants have been identified on about 200 plasmid types in different sequence types (STs) of species from 11 bacterial families. NDM has although been spread over our country and caused serious clinical consequences, its genetic data is still not much. Therefore, the aims of this study are characterization of antibiotic resistance, sequence types, and factors contributing to the spread of plasmids carrying *bla*NDM genes in our country, answering the research questions: 1) The dynamic evolution of *bla*NDM genetic context in the transmission of *bla*NDM genes? 2) Is the *bla*NDM genetic context diversity associated with their transmission rate over time? 3) Are there predominant *bla*NDM - carrying STs among species? How does the transfer of *bla*NDM genes between different STs?

To achieve the above objectives, we performed experiments on clinical Gram-negative *Enterobacteriaceae* resistant to carbapenem, including: bacterial isolation, determination of antibiotic resistance pattern by disc diffusion and MIC methods, screening for strains carried *bla*NDM genes by PCR; Studying the genetic characteristics of representative strains by next-generation sequencing and using bioinformatics tools for: (i) Detection of NDM variants; (ii) Identification of plasmids carrying the *bla*NDM genes; (iii) Analysis of structure and composition of the *bla*NDM genetic context, and (iv) Determination of ST lineages and analysis of *bla*NDM gene transfer through conjugation mechanism.

A total of 142 carbapenem-resistant Gram-negative *Enterobacteriaceae* strains were isolated in 4 hospitals in Ho Chi Minh City during 2010-2017, with the most prevalence is *K. pneumoniae* (75%). 64/142 (45%) strains were *bla*NDM positive. The number of *bla*NDM-carrying isolates have been increased since 2015 (from 50% to 74%). All isolates showed resistance/intermediate phenotypes to most antibiotics used in current treatment. There are 2 variants of NDM in the studied strains: NDM-1 (8/17 strains) and NDM-4 (9/17 strains) in which NDM-4 has gradually replaced NDM-1 since 2015, with increased carbapenemase activity. Besides, we found 6 *bla*NDM-carrying plasmid groups, the most prevalence is IncF (11/17) (including IncFII(Yp), IncFII(K), and IncFIA), the remaining groups are IncC, IncX3, and IncHI2. In addition, the obtained results also answer the research questions:

1) The diversity of the *bla*NDM genetic contexts has contributed to the ability to rapidly spread the *bla*NDM genes. There are at least four distinct IS elements involved in *bla*NDM transfer as well as other antibiotic resistance genes. The transposable elements and their respective plasmids are ISCR21/IS3000 and/or IS26 on IncX3 and IncFII(K); ISCR21 on IncFIIY(p); ISCR1 and/or IS26 on IncC and IncFIA; and IS3000 on IncHI2. Especially, the diversity of genetic mobile elements around the *bla*NDM genes may have contributed to the integration of these resistance genes, resulting in the increased number of resistance genes in *bla*NDM-carrying plasmids. Besides, in most identified plasmid groups, we found Tn*5403* elements, Tn3-like transposons, which have been identified to contain enzymes capable of helping non-conjugative plasmids thereby increasing the ability to spread *bla*NDM genes between bacteria.

2) In this study, *bla*NDM-4 gene might have associated with IncF plasmid mainly in *K. pneumoniae* carrying sequence type 15 (ST15) and sequence type 16 (ST16) appeared from 2014 and 2015. NDM-4 was the variant with dominant resistance phenotype than NDM-1 and IncF was a group of plasmids with capable of conjugation. In other hand, ST15 and ST16 were the dominant international sequence type recorded in over the world. Thus, there had been an evolution and adaptation of *K. pneumoniae* strains carrying *bla*NDM into the dominant clones in this study.

3) In *E. coli,* we found ST405 strains circulated in all 3 hospitals in 2015 and 2017; ST648 strains carrying *bla*NDM-1 on plasmid IncHI2 circulated in Children’s hospital 2 in 2015 and 2017; ST101 strains carrying *bla*NDM-1 on plasmid IncFIIY(p) circulated in Binh Dan hospital in 2013 and 2015, and ST410 strains circulated in Children’s hospital 1 in 2017. In *K. pneumoniae*, we found ST15 and ST16 strains carrying *bla*NDM-4 on IncF plasmid in Children’s hospital 2 in 2015 and 2017; ST983 was mostly recorded in Children’s hospital 1 in 2015. Regarding the transmission of *bla*NDM (via conjugation), our results showed that *bla*NDM gene could be transmitted from *K. pneumoniae/E. coli* to *E. coli* (J53) with an average frequency of 10-4 to 10-6. Conducting conjugation with other recipient species as well as investigating other gene transfer mechanisms should be carried out in further studies.

Moreover, two of our results were first recorded in the literature: 1) An insertion sequence harboring IS*Kpn19* and Tn*6901* in the genomic context of *bla*NDM-1 of Res10BD-27 strain. This insertion made the genomic context of *bla*NDM-1 in this strain more complex with 6 resistance genes, including *adh*, *glo*, *fgh*, *bla*NDM-1, *ble*MBL, and *bla*SHV-12, which may also affect the dissemination and expression of *bla*NDM-1; 2) Two novel sequence types including ST6280 in Res15ND1-30 strain and ST6270 in Res15ND2-20 strain.

**2. NEW RESULTS OF THESIS**

There are three main mechanisms in the acquisition of carbapenemase-encoding genes in Gram-negative bacteria: lineage propagation (ST), transmission via plasmid conjugation, and through mobile genetic elements that allow resistant genes acquisition and/or separation. In this study, we found all of the above mechanisms in the study isolates and also the combination of all three mechanisms on the same *K. pneumoniae* ST16 isolates that carry IncFII(K) plasmids. Our results have contributed to clarify the mechanism of *bla*NDM genes transmission, thereby explaining the rapidly increasing rate of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. In our opinion, hospital infection prevention and control are still the effective measures to reduce the antibiotic resistant rate and spread. It is necessary to early and strictly screen and isolate patients with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, especially hospital transfer patients, and keep follow of ST strains circulating in hospitals to promptly detect epidemic strains. To do this, it is urgent to develop rapid diagnostic techniques to identify the antibiotic resistant phenotype, and the epidemic ST strains (e.g., ST16).

**3. PRACTICAL APPLICATIONS/APPLICATIONS OR ISSUES THAT NEED CONTINUED RESEARCH**

In the emergence of multi-drug resistant especially carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, our study results are helpful data for clinical treatment and management. For being more effective, it is necessary to strengthen the cooperation and exchange between research teams and clinicians, continue to carry out the surveillance of antibiotic-resistant bacteria on larger scale with prospective studies. In addition, we should keep performing genetic analysis of antibiotic resistance genes on a larger number of samples, including samples collected from the environment, veterinary, and community in addition to clinical samples.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 16 tháng 6 năm 2023

|  |  |
| --- | --- |
| **TẬP THỂ CÁN BỘ HƯỚNG DẪN**  | **NGHIÊN CỨU SINH**  |

**XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO**

**HIỆU TRƯỞNG**