

# Giá trị của kiểu gen trong xác định *Klebsiella pneumoniae* kháng carbapenem gây nhiễm khuẩn huyết

## The value of genotype in identifying carbapenem resistance of *Klebsiella pneumoniae* causing blood stream infections

Trịnh Văn Sơn, Nguyễn Đăng Mạnh, Đào Thanh Quyên,  
Nguyễn Thị Kim Phương và Lê Hữu Song

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

### Tóm tắt

**Mục tiêu:** Tìm hiểu giá trị của một số kiểu gen trong xác định kiểu hình kháng kháng sinh nhóm carbapenem của các chủng *K. pneumoniae* gây nhiễm khuẩn huyết (NKH). **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu quan sát mô tả trên 50 chủng *K. pneumoniae* phân lập từ mẫu máu của 50 bệnh nhân NKH tại Bệnh viện TWQĐ 108 từ 10/2014 đến 05/2016. Kháng sinh đồ thực hiện trên hệ thống máy Vitek II của hãng BioMerieux, Pháp. Các gen kháng kháng sinh được phát hiện bằng Multiplex PCR tại Trung tâm nghiên cứu Y học Việt Đức, Bệnh viện TWQĐ 108. **Kết quả:** Tất cả có 13/50 (26%) chủng *K. pneumoniae* kháng carbapenem; các chủng này mang các gen NDM-1, VIM, KPC và OXA-48 với tỷ lệ tương ứng là 24,0%, 12,0%, 2,0% và 2,0%. Tần suất xuất hiện gen NDM-1, TSC, 2POS, CN và NoC ở các chủng không nhạy cao hơn có ý nghĩa so với chủng còn nhạy cảm với kháng sinh nhóm carbapenem ( $p < 0,05$ ); Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương tính và giá trị tiên đoán âm tính của các dấu ấn kiểu gen này trong xác định kiểu hình kháng carbapenem lần lượt là (từ 46,2% đến 84,6%), (62,2% đến 91,9%), (42,1% đến 66,7%) và (82,5% đến 92%). **Kết luận:** Có thể sử dụng kiểu gen để xác định kiểu hình kháng kháng sinh nhóm carbapenem của các chủng *K. pneumoniae*.

**Từ khóa:** Nhiễm khuẩn huyết, kháng carbapenem, *K. pneumoniae*, gen kháng thuốc.

### Summary

**Objective:** To evaluate the value of resistant genotype to predict carbapenem resistance phenotype of *K. pneumoniae* causing blood stream infections. **Subject and method:** A total of 50 *K. pneumoniae* isolated from patients with BSIs, who were treated at the 108 Military Central Hospital (108 MCH), in Hanoi, from Oct. 2014 to May 2016. All strains were identified and measured antibiotic susceptibility by using Vitek II Automated system (BioMerieux, France). Genes producing beta-lactamase were screened using in-house Multiplex PCR at Vietnamese-German Center for Medical Research, 108 MCH. **Result:** In total, 13/50 (26%) of *K. pneumoniae* isolates were of carbapenem resistances. These strains carried out carbapenemase genes including NDM-1 (24%), VIM (12%), KPC (2%) and OXA-48 (2%), respectively.

Ngày nhận bài: 22/03/2020, ngày chấp nhận đăng: 14/04/2020

Người phản hồi: Lê Hữu Song - Email: lehuusong@108-icid.com - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Frequency of NDM-1, TSC, 2POS, CN and NoC genes in carbapenem resistant strains were significantly higher than those in carbapenem susceptible strains ( $p < 0.05$ ). The sensitivity, specificity, positive predict value and negative predict value of these genotypes to predict resistant carbapenem were (46.2% to 84.6%), (62.2% to 91.9%), (42.1% to 66.7%) and (82.5% to 92%), respectively. *Conclusion:* Genotypes can be used to predict carbapenem susceptibility of *K. pneumoniae* causing BSIs.

*Keywords:* Sepsis, carbapenem resistance, *K. pneumoniae*, genotypic resistance.

## 1. Đặt vấn đề

Nhiễm khuẩn huyết do các chủng vi khuẩn kháng thuốc và đa kháng thuốc không ngừng gia tăng và là thách thức với hệ thống chăm sóc y tế trên toàn thế giới. *Klebsiella pneumoniae* thuộc họ vi khuẩn đường ruột và là tác nhân quan trọng trong cả bệnh lý nhiễm khuẩn cộng đồng cũng như nhiễm khuẩn bệnh viện. Ngày nay các chủng *K. pneumoniae* kháng cao với các kháng sinh sử dụng rộng rãi trong lâm sàng như nhóm beta-lactam, fluoroquinolone và aminoglycosides, đặc biệt trong những năm gần đây xuất hiện các chủng kháng carbapenem với tỷ lệ không ngừng gia tăng [1].

Các chủng *K. pneumoniae* kháng carbapenem là các chủng đa kháng thuốc, đồng thời kháng với nhiều nhóm kháng sinh được sử dụng phổ biến trên lâm sàng. Nghiên cứu về các chủng *K. pneumoniae* kháng carbapenem cho thấy có hai cơ chế chính là thay đổi tính thấm màng tế bào kết hợp với tăng biểu hiện của các beta-lactamase có hoạt tính carbapenemase yếu (chủ yếu là CTX-M và AmpC cephalosporinases) và sinh enzyme carbapenemases, trong đó các chủng sinh carbapenemases đóng vai trò quan trọng trong lâm sàng [2]. Đặc điểm và cơ chế kháng carbapenem của các chủng *K. pneumoniae* cũng khác nhau tùy từng khu vực địa lý, dịch tễ học phân tử cũng như thói quen sử dụng kháng sinh trên lâm sàng ở từng bệnh viện.

Các chủng *K. pneumoniae* đa kháng thuốc thường kèm theo các yếu tố xâm nhập và là tác nhân gây nhiễm khuẩn toàn thân như nhiễm khuẩn huyết, là những bệnh lý cần được điều trị kháng sinh

sớm và phù hợp. Kết quả cấy khuẩn và làm kháng sinh đồ đòi hỏi thời gian chờ đợi. Với sự phát triển của công nghệ phân tử, cho kết quả về kiểu gen nhanh hơn. Tuy nhiên, còn thiếu dữ liệu về mức độ tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình [3]. Với những lý do trên chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm đánh giá tương quan kiểu gen và kiểu hình kháng carbapenem của các chủng *K. pneumoniae* gây nhiễm khuẩn huyết.

## 2. Đối tượng và phương pháp

### 2.1. Đối tượng

Nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 50 chủng *K. pneumoniae* được phân lập từ máu của 50 bệnh nhân (BN) NKH tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ tháng 10/2014 đến tháng 05/2016. BN được chẩn đoán dựa trên Đồng thuận Quốc tế lần thứ 2 (Surviving Sepsis Campaign 2012) và có kết quả cấy máu dương tính với *K. pneumoniae* [4].

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Cấy máu và định danh vi khuẩn

BN khi có các triệu chứng nghi ngờ nhiễm khuẩn sẽ được cấy máu theo quy trình của Khoa Vi sinh vật - Bệnh viện TWQĐ 108. Mỗi BN được cấy hai bình máu, mỗi bình 8 - 10ml máu lấy từ hai vị trí khác nhau. Bình cấy máu sử dụng bình BACTEC™ Plus Aerobic/F của hãng Becton Dickinson, Hoa Kỳ và bình cấy được theo dõi tự động với hệ thống máy BD BACTEC™ 9120 cùng hãng. Khi các bình báo dương tính bệnh phẩm sẽ được nhuộm soi Gram và cấy chuyển sang đĩa thạch máu, sau đó các khuẩn lạc sẽ được định danh vi khuẩn và làm kháng sinh đồ bằng hệ thống máy định danh tự động VITEK® 2 của

hãng BioMerieux, Pháp. Các chủng khi có kết quả cấy dương tính sẽ được bảo quản trong các tube glycerol 20% ở -80°C chờ làm xét nghiệm về gen kháng thuốc.

### 2.2.2. Kháng sinh đồ

Đánh giá kháng sinh đồ dựa trên hệ thống xét nghiệm tự động VITEK® 2 của hãng BioMerieux, Pháp, sử dụng nồng độ ức chế tối thiểu và được phiên giải kết quả dựa trên tiêu chuẩn của Viện tiêu chuẩn xét nghiệm lâm sàng (Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI 2016). Các kháng sinh nhóm carbapenem được khảo sát bao gồm: Ertapenem, imipenem và meropenem.

### 2.2.3. Xét nghiệm gen mã hóa sinh beta-lactamase

Các chủng *K. pneumoniae* sau khi được bảo quản ở -80°C sẽ được cấy lại trong môi trường thạch máu, các khuẩn lạc sẽ được tách DNA theo quy trình chuẩn và được chạy multiplex-PCR để xác định các gen mã hóa sinh beta-lactamase cần khảo sát, bao

gồm: ESBL-1 (SHV, TEM, CTX-M); CARBA-1 (NDM, SPM, VIM); CARBA-2 (IMP, AIM, KPC); CARBA-3 (OXA-23, OXA-48, OXA-58). Kết quả được đọc dựa trên băng điện di thạch agarose 1,5%.

### 2.3. Phân tích số liệu

Phân tích tương quan kiểu hình kháng thuốc của các chủng mang từng kiểu gen kháng thuốc cũng như kiểu gen kết hợp như 2POS: chủng mang ít nhất hai trong ba gen TEM, SHV hoặc CTX-M; TSC: chủng mang đồng thời cả ba gen TEM, SHV và CTX-M; TSCN: chủng mang đồng thời 4 gen TEM, SHV, CTX-M và NDM-1; NoC: Chủng mang một trong hai gen NDM-1 or CTX-M; CN: Chủng mang đồng thời 2 gen CTX-M và NDM-1. Các biến định lượng được thể hiện với số lượng (tỷ lệ phần trăm). So sánh các biến định lượng sử dụng kiểm định  $\chi^2$ , sự khác biệt được xem là có ý nghĩa thống kê khi  $p < 0,05$ . Độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán âm tính và giá trị tiên đoán dương tính được tính dựa trên công thức của bảng 2x2.

## 3. Kết quả

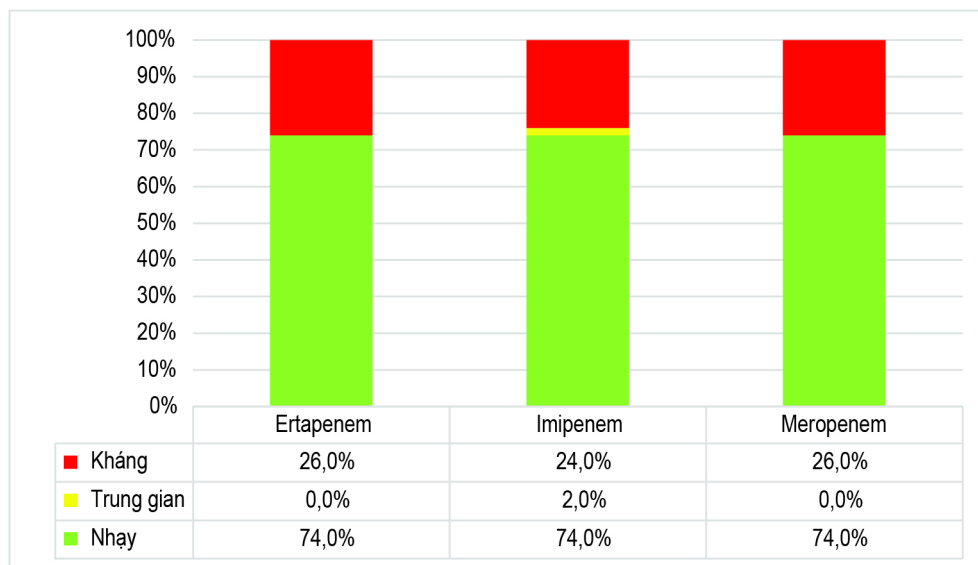
### 3.1. Hình ảnh băng điện di các gen được khảo sát



Hình 1. Hình ảnh băng điện di của các gen VIM, SPM và NDM-1

**Nhận xét:** M50 là marker điện di band từ 50bp đến 1000bp, (-) chuẩn âm, (+) chuẩn dương với gen VIM (309bp), SPM (291bp) và NDM-1 (200bp), các mẫu 1, 2, 4 và 6 dương tính với gen NDM-1, mẫu 3 dương tính với gen SPM, các mẫu còn lại âm tính với ba gen khảo sát.

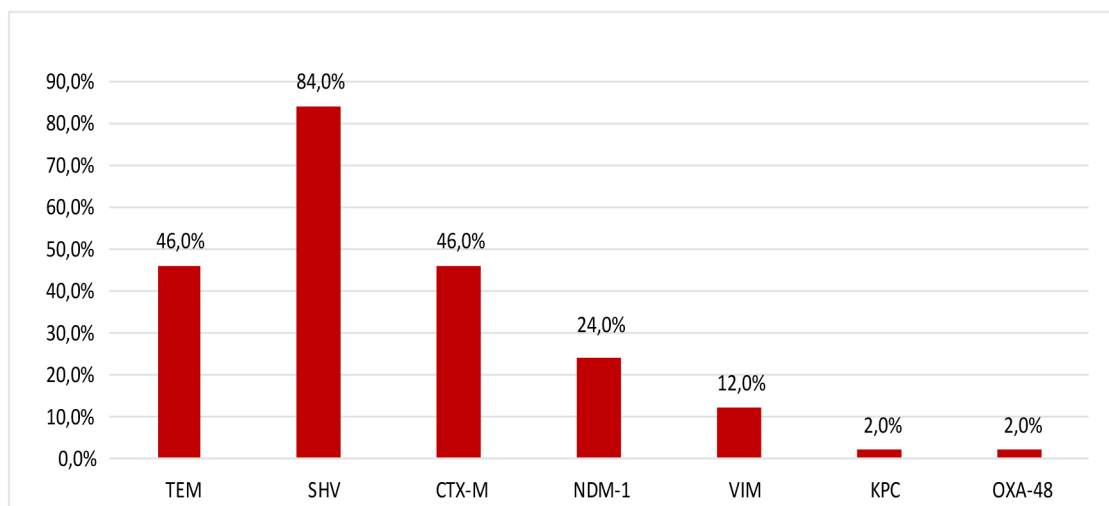
### 3.2. Đặc điểm kháng kháng sinh



**Biểu đồ 1.** Tỷ lệ chủng *K. pneumoniae* kháng carbapenem

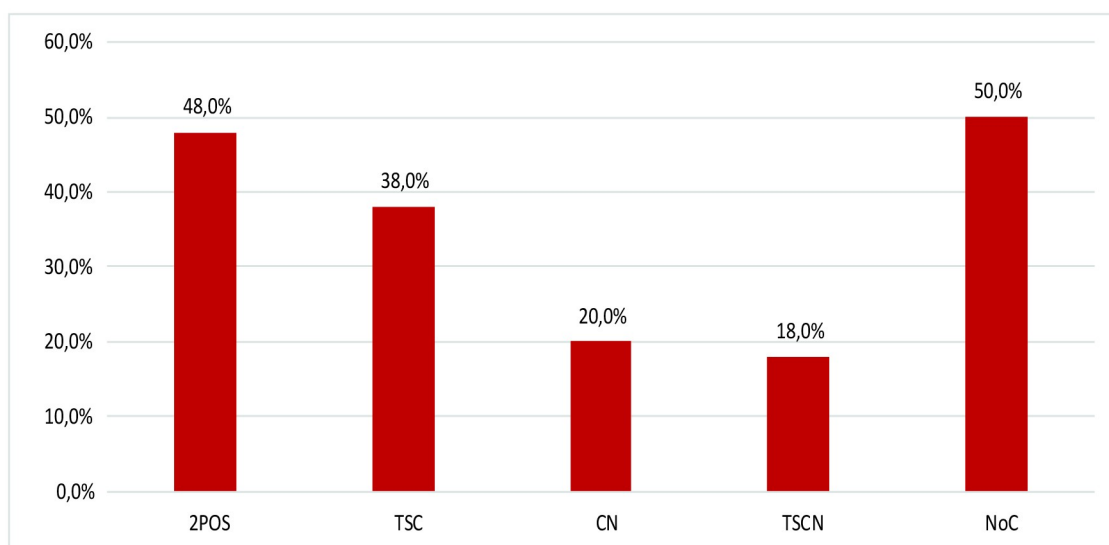
**Nhận xét:** Các kháng sinh nhóm carbapenem đều đã bị kháng (24-26%) bởi các chủng *K. pneumoniae* gây NKH.

### 3.3. Tần suất xuất hiện các gen mã hóa sinh beta-lactamases



**Biểu đồ 3.** Tần suất xuất hiện các gen mã hóa sinh beta-lactamase

**Nhận xét:** Các gen mã hóa sinh ESBLs như SHV, TEM và CTX-M xuất hiện nhiều nhất (46-84%), chỉ có 2% chủng mang các gen KPC, OXA-48. Không ghi nhận các chủng mang gen IMP, AIM, SPM.



**Biểu đồ 4.** Tần suất xuất hiện các chủng mang kiểu gen kết hợp

*Nhận xét:* 50% chủng mang 1 trong 2 gen NDM-1 và CTX-M; 18% chủng mang đồng thời cả 4 gen; 38% chủng mang 3 gen và 48% chủng mang ít nhất 2 trong 3 gen TEM, SHV và CTX-M.

### 3.4. Giá trị của kiểu gen trong chẩn đoán kiểu hình kháng beta-lactam

**Bảng 1.** Tương quan kiểu gen và kiểu hình của các chủng

| Carbapenem      | Không nhạy (*)<br>(n = 13) |         | Nhạy cảm<br>(n = 37) |         | <i>p-value</i> |
|-----------------|----------------------------|---------|----------------------|---------|----------------|
|                 | Số lượng<br>(n = 13)       | Tỷ lệ % | Số lượng<br>(n = 37) | Tỷ lệ % |                |
| <b>Kiểu gen</b> |                            |         |                      |         |                |
| NDM-1           | 7                          | 53,8    | 5                    | 13,5    | 0,005          |
| VIM             | 0                          | 0       | 6                    | 16,2    | 0,146          |
| TSC             | 8                          | 61,5    | 11                   | 29,7    | 0,045          |
| 2POS            | 10                         | 76,9    | 14                   | 37,8    | 0,017          |
| TSCN            | 6                          | 46,2    | 3                    | 8,1     | 0,004          |
| CN              | 6                          | 46,2    | 4                    | 10,8    | 0,009          |
| NoC             | 11                         | 84,6    | 14                   | 37,8    | 0,004          |

*Nhận xét:* Kiểu gen NDM-1, TSC, TSCN và NoC phân bố với tỷ lệ cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm không nhạy với carbapenem so với nhóm còn nhạy với carbapenem.

*Ghi chú:* (\*) Trong số 13 chủng, có 12 chủng kháng với cả 3 kháng sinh này, 01 chủng kháng với ertapenem và meropenem nhưng chỉ kháng trung gian với imipenem.

**Bảng 2. Giá trị của kiểu gen trong chẩn đoán kiểu hình kháng carbapenem**

| Kiểu gen | Độ nhạy (%) | Độ đặc hiệu (%) | Giá trị tiên đoán dương tính (%) | Giá trị tiên đoán âm tính (%) |
|----------|-------------|-----------------|----------------------------------|-------------------------------|
| NDM-1    | 53,8        | 86,5            | 58,3                             | 84,2                          |
| TSC      | 61,5        | 70,3            | 42,1                             | 83,9                          |
| TSCN     | 46,2        | 91,9            | 66,7                             | 82,9                          |
| CN       | 46,2        | 89,2            | 60,0                             | 82,5                          |
| NoC      | 84,6        | 62,2            | 44,0                             | 92,0                          |

**Nhận xét:** Các chủng *K. pneumoniae* mang kiểu gen NDM-1, TSCN và CN có giá trị chẩn đoán kháng carbapenem với độ đặc hiệu cao. Kiểu gen NoC cho độ nhạy cao trong chẩn đoán kiểu hình không còn nhạy với carbapenem.

#### 4. Bàn luận

Các chủng *K. pneumoniae* KKS là một trong những tác nhân chính gây nhiễm khuẩn bệnh viện và NKH. Ngày nay, tỷ lệ các chủng *K. pneumoniae* kháng carbapenem không ngừng gia tăng, một nghiên cứu tại Rome, tỷ lệ các chủng *K. pneumoniae* sinh enzyme carbapenemases tăng từ 4,2% năm 2007 đến 51,6% năm 2015 [5]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi gặp 13/50 (26%) các chủng *K. pneumoniae* gây nhiễm khuẩn huyết không còn nhạy cảm với các kháng sinh nhóm carbapenem. Kết quả này thấp hơn báo cáo trong khu vực với SMART (2018) về các nhiễm khuẩn ổ bụng trong giai đoạn 2008-2014 cho thấy các chủng *K. pneumoniae* không còn nhạy với ertapenem gặp với tỷ lệ là 40,9% [6]. Một số báo cáo khác gặp tỷ lệ chủng *K. pneumoniae* kháng carbapenem thấp hơn như tại Hàn Quốc gặp < 0,1% năm 2013 và 2% năm 2015 [7]. Điều này phụ thuộc vào tình hình sử dụng kháng sinh và dịch tễ học kháng thuốc của từng quốc gia.

Từ khi được ghi nhận lần đầu tiên năm 2009 ở chủng *K. pneumoniae*, gen NDM-1 đã được ghi nhận ở hầu hết các quốc gia, đồng thời nhiều ho gen khác đã được ghi nhận và phân bố rải rác trên toàn thế giới. Trong số các họ gen mã hóa sinh carbapenemase, gen NDM được ghi nhận ở nhiều nước và đóng vai trò chính trong cơ chế kháng carbapenem ở khu vực Đông Nam Á [8]. Các gen

khác thuộc họ Metallo-beta-lactamases (IMP, VIM) và cả họ OXA đã được ghi nhận ở một vài quốc gia. Các chủng mang gen KPC không phổ biến ở khu vực Đông Nam Á, được chính thức báo cáo tại Singapore và Thái Lan [9, 10], mặc dù chúng được ghi nhận phổ biến ở Bắc Mỹ và Châu Âu [11]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho kết quả tương tự với gen NDM-1 chiếm chủ yếu.

Cho đến nay, các chủng vi khuẩn kháng thuốc, hầu hết đều mang các gen kháng kháng sinh trên plasmid, qua quá trình lan truyền, tiếp hợp, tải nạp, các chủng vi khuẩn có thể mang nhiều gen kháng kháng sinh, cùng cả nhóm gen hoặc khác nhóm gen, qua đó tạo ra các chủng đa kháng thuốc [12]. Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận tỷ lệ cao các chủng mang đồng thời nhiều gen mã hóa sinh beta-lactamase được khảo sát: 18,0% chủng *K. pneumoniae* mang cả 04 gen NDM-1, TEM, CTX-M và SHV; và 48,0% mang ít nhất hai trong ba gen TEM, SHV và CTX-M. Một số nghiên cứu thậm chí còn gặp tỷ lệ mang đa gen kháng thuốc cao hơn từ 72,7% đến 83,3% [13]. Sự khác biệt này là do đặc điểm dịch tễ của các chủng kháng thuốc ở từng khu vực.

Các gen mã hóa enzyme carbapenemase chịu tác động của nhiều các cơ chế điều hòa cũng như sự tác động qua lại của các gen kháng thuốc làm ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện khi các chủng vi khuẩn chịu áp lực của kháng sinh. Vì vậy không phải tất cả các chủng mang kiểu gen đều có biểu hiện ra kiểu hình [3]. Điều này lý giải cho kết quả nghiên cứu của chúng tôi vẫn có 5 chủng mang gen NDM-1 và 6 chủng mang gen VIM nhưng không có biểu hiện kiểu hình kháng carbapenem. Cơ chế chính kháng carbapenem trong nghiên cứu của chúng tôi là

NDM-1, chiếm 53,8%. Các nghiên cứu cho thấy các chủng kháng carbapenem thường là các chủng đa kháng thuốc nên chúng thường mang đa gen kháng kháng sinh [12]. Kết quả Bảng 2 cho thấy sử dụng gen NDM-1, hoặc tổ hợp các gen (TSC, TSCN, CN, NoC) để chẩn đoán kiểu hình kháng với carbapenem với các chủng *K. pneumoniae* gây nhiễm khuẩn huyết cho giá trị tiên đoán âm tính giao động 82,5% đến 92%; tuy nhiên giá trị tiên đoán dương tính chỉ giao động 42,1 đến 66,7%. Điều này cho thấy rằng còn các cơ chế kháng carbapenem khác cũng đóng vai trò quan trọng như cơ chế giảm tính thấm màng tế bào kết hợp với tăng mức độ biểu hiện của cephalosporinases phổ rộng [2], các cơ chế mà nghiên cứu này chưa đánh giá hết.

## 5. Kết luận

Có thể sử dụng kiểu gen để xác định kiểu hình kháng kháng sinh nhóm carbapenem của các chủng *K. pneumoniae* gây nhiễm khuẩn huyết.

*Nghiên cứu đã được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và Công nghệ Quốc gia (Nafosted) qua đề tài mã số 108.06-2017.21.*

## Tài liệu tham khảo

- Codjoe FS, Donkor ES (2018) *Carbapenem resistance: A review*. Med Sci (Basel) 6(1): 1.
- Pitout JD, Nordmann P, Poirel L (2015) *Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae, a key pathogen set for global nosocomial Dominance*. Antimicrob Agents Chemother 59(10): 5873-5884.
- Piddock LJV (2016) *Assess drug-resistance phenotypes, not just genotypes*. Nature Microbiology 1: 16120.
- Dellinger RP et al (2013) *Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012*. Crit Care Med 41(2): 580-637.
- Angelis De G et al (2018) *Incidence and antimicrobial resistance trends in bloodstream infections caused by ESKAPE and Escherichia coli at a large teaching hospital in Rome, a 9-year analysis (2007-2015)*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 37(9): 1627-1636.
- Jean SS et al (2018) *Ertapenem non-susceptibility and independent predictors of the carbapenemase production among the Enterobacteriaceae isolates causing intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART)*. Infection and drug resistance 11: 1881-1891.
- Kim D et al (2017) *Increasing resistance to extended-spectrum cephalosporins, fluoroquinolone, and carbapenem in Gram-Negative bacilli and the emergence of carbapenem non-susceptibility in Klebsiella pneumoniae: Analysis of Korean Antimicrobial Resistance Monitoring System (KARMS) data from 2013 to 2015*. Ann Lab Med 37(3): 231-239.
- Malchione MD et al (2019) *Carbapenem and colistin resistance in Enterobacteriaceae in Southeast Asia: Review and mapping of emerging and overlapping challenges*. Int J Antimicrob Agents 54(4): 381-399.
- Koh TH et al (2013) *Acquired carbapenemases in Enterobacteriaceae in Singapore, 1996-2012*. Pathology 45(6): 600-603.
- Netikul T et al (2014) *Emergence of novel bla (KPC-13) among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Thailand*. Int J Antimicrob Agents 44(6): 568-569.
- Chen L et al (2014) *Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae: Molecular and genetic decoding*. Trends in microbiology 22(12): 686-696.
- Munita JM, Arias CA (2016) *Mechanisms of antibiotic resistance*. Microbiol Spectrum 4(2).
- Lin CF et al (2010) *Genotypic detection and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a regional hospital in central Taiwan*. J Med Microbiol 59(6): 665-671.