

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Kiều Duy Hùng

**GIẢI TRÌNH TỰ VÀ PHÂN TÍCH BỘ GENE MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN
BURKHOLDERIA SPP. ĐA KHÁNG THUỐC PHÂN LẬP TẠI BỆNH VIỆN 108
TRONG NĂM 2021 – 2022**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2025

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Kiều Duy Hùng

**GIẢI TRÌNH TỰ VÀ PHÂN TÍCH BỘ GENE MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN
BURKHOLDERIA SPP. ĐA KHÁNG THUỐC PHÂN LẬP TẠI BỆNH VIỆN 108
TRONG NĂM 2021 – 2022**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC
NGÀNH: SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Lê Thị Thu Hằng
2. PGS. TS. Đồng Văn Quyền

Two handwritten signatures in blue ink are present. The first signature is above the first supervisor's name, and the second, longer signature is above the second supervisor's name.

Hà Nội – 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực, nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả



Kiều Duy Hùng

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc, sự khâm phục và kính trọng nhất tới TS. Lê Thị Thu Hằng và PGS. TS. Đồng Văn Quyền – người đã tận tâm hướng dẫn, chỉ dạy cho tôi về mặt chuyên môn, và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn lãnh đạo và các đồng nghiệp tại Khoa Khoa học Sự sống - Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội về sự ủng hộ to lớn, những lời khuyên bổ ích và những góp ý quý báu trong việc thực hiện và hoàn thiện luận văn. Tôi xin gửi lời tri ân đến Khoa Vi sinh, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 đã hỗ trợ cung cấp các chủng vi khuẩn phân lập quý giá, là cơ sở quan trọng giúp tôi hoàn thành nghiên cứu này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ và thầy cô phụ trách Ngành Sinh học Thực nghiệm, đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới toàn thể gia đình, bạn bè và những người thân đã luôn luôn quan tâm, khích lệ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tác giả



Kiều Duy Hùng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	vii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. TỔNG QUAN VỀ PHỨC HỢP VI KHUẨN <i>BURKHODELRIA</i> <i>CEPACIA</i> (BCC).....	3
1.1.1. Đặc điểm chung và phân bố của nhóm BCC	3
1.1.2. Tính cấp thiết gây ra của bệnh gây ra bởi BCC.....	3
1.2. PHÂN LOẠI, ĐỊNH DANH VÀ ĐIỀU TRỊ NHIỄM KHUẨN BCC	4
1.2.1. Các phương pháp chẩn đoán và thử thách	4
1.2.2. Phương pháp điều trị và kháng kháng sinh của BCC	6
1.3. GIẢI MÃ HỆ GENE BCC BẰNG CÔNG NGHỆ GIẢI TRÌNH TỰ GENE THỂ HỆ MỚI (NGS).....	9
1.3.1. Tổng quan công nghệ giải trình tự hệ gene thể hệ mới (NGS) Illumina	9
1.3.2. Công nghệ giải trình tự toàn bộ hệ gene (WGS) Nanopore.....	10
1.3.3. Đặc điểm hệ gene nhóm phức hợp khuẩn Gram-âm BCC.....	12
1.3.4. Các cụm gene gây bệnh (virulence) và kháng kháng sinh (AMR) đã được nghiên cứu.....	14
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	16
2.1.1. Chủng vi khuẩn	16
2.1.2. Hóa chất và thiết bị.....	16

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	16
2.2.1. Thử nghiệm kháng sinh đồ.....	16
2.2.2. Tách chiết DNA tổng số và giải trình tự hệ gene.....	17
2.2.3. Phân tích chất lượng dữ liệu và lắp ráp de novo hệ gene.....	17
2.2.4. Định danh phân tử, xác định kiểu gene (genotype)	18
2.2.5. Phân tích phát sinh chủng loài của các chủng <i>Burkholderia</i> spp. dựa trên trình tự gene lõi (core genome).....	18
2.2.6. Xác định đặc điểm phân tử liên quan đến tính kháng kháng sinh và các gene độc lực liên quan đến khả năng gây bệnh, lây nhiễm.	18
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	21
3.1. Phân lập, định danh các chủng vi khuẩn <i>Burkholderia</i> spp.	21
3.2. Đặc điểm bộ gene các chủng <i>Burkholderia</i> spp.	22
3.2.1. Kết quả giải trình tự gene vi khuẩn	22
3.2.2. Lắp ráp de novo và tạo bộ gene lai hoàn chỉnh cho các chủng <i>Burkholderia</i> spp.	23
3.3. Định danh vi khuẩn bằng trình tự 16S rRNA và xây dựng cây phát sinh loài bằng trình tự core genome (các gene lõi).....	25
3.4. Định tuýp phân tử, kiểu gene các chủng <i>B. cenocepacia</i>	28
3.5. Đặc điểm di truyền kháng kháng sinh và gây bệnh của các chủng <i>B. cenocepacia</i>	29
3.5.1. Kiểu gene kháng kháng sinh	29
3.5.2. Đặc điểm di truyền liên quan đến khả năng gây bệnh của <i>B. cenocepacia</i>	31
3.6. Cơ chế chuyển hoá của vi khuẩn	33
3.7. Các yếu tố di truyền di động của vi khuẩn <i>B. cenocepacia</i>	38
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	43
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	44
PHỤ LỤC.....	50

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Giải nghĩa Tiếng Anh	Giải nghĩa Tiếng Việt
ARG	Antibiotic Resistance Gene	Gene kháng kháng sinh
BBC	<i>Burkholderia cepacia</i> Complex	Phức hợp <i>Burkholderia cepacia</i>
CF	Cystic Fibrosis	Bệnh xơ nang phổi
CGD	Chronic Granulomatous Disease	Bệnh u hạt mãn tính
DNA	Deoxyribonucleic acid	Phân tử mang thông tin di truyền
MLST	Multi Locus Sequence Typing	Tổ hợp trình tự nhiều vùng gene
NGS	Next generation sequencing	Giải trình tự thế hệ mới
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid	RNA ribosome
WGS	Whole Genome Sequencing	Giải trình tự toàn bộ hệ gene

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Kết quả so sánh FastQC kiểm tra chất lượng giải trình tự đoạn ngắn đọc cặp (paired-end), trước (Raw) và sau khi sử dụng (Trimmed) Trimmomatic trên 4 chủng <i>Burkholderia</i> spp. được phân lập.....	23
Bảng 3.2: Kết quả QC dữ liệu trình tự đoạn dài Nanopore các chủng <i>Burkholderia</i> spp.	23
Bảng 3.3. So sánh số lượng contigs và N50, L50 giữa trình tự SPAdes và Unicycler.....	24
Bảng 3.4. Đặc điểm bộ gene các chủng <i>Burkholderia</i> spp.....	25
Bảng 3.5. Kết quả định danh bằng vi khuẩn <i>Burkholderia</i> spp. bằng MALDI-TOF và so sánh trình tự gene 16s rRNA.....	26
Bảng 3.6. Kiểu trình tự MLST và thông tin kiểu gene của 4 chủng <i>B. cenocepacia</i>	29
Bảng 3.7. Dữ liệu MLST và kiểu gene của các chủng <i>Burkholderia</i> spp. phân lập ở Việt Nam	29
Bảng 3.8. Số lượng KO liên quan đến các cơ chế trao đổi chất trên bốn chủng <i>B. cenocepacia</i>	34
Bảng 3.9. Tổng hợp thông tin các vùng prophage của bốn chủng.....	40

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Các cơ chế kháng kháng sinh của BCC.	8
Hình 1.2. Các bước giải trình tự thế hệ mới (NGS) Illumina	10
Hình 1.3. Các bước trong giải trình toàn bộ hệ gene (WGS) Nanopore.....	12
Hình 3.1. Kháng sinh đồ các chủng <i>Burkholderia</i> spp.	22
Hình 3.2. Cây phát sinh chủng loài của 4 chủng <i>B. cenocepacia</i> trong nghiên cứu này (màu đỏ) so với các chủng BCC trên thế giới dựa trên core genome. Độ tin cậy phân nhánh các chủng trên cây phả hệ được thể hiện thông qua màu sắc bootstrap. Các giá trị bootstrap màu xanh dương (1,0) phản ánh mức độ tin cậy cao, và giảm dần đối với các màu tương ứng.....	28
Hình 3.3. Biểu đồ nhiệt thể hiện các gene kháng kháng sinh theo nhóm thuốc được tìm thấy ở các chủng <i>B. cenocepacia</i>	31
Hình 3.4. Phân bố gene độc lực theo nhóm trong bộ genome của các chủng <i>B. cenocepacia</i>	33
Hình 3.5. Sự phân bố của các vùng prophage ở 4 chủng BCC.....	41

MỞ ĐẦU

Burkholderia spp. là một nhóm vi khuẩn Gram âm sống tự do trong môi trường tự nhiên, đặc biệt phổ biến trong đất, nước và các môi trường giàu chất hữu cơ. Trong đó, nhóm vi khuẩn thuộc phức hợp *Burkholderia cepacia* (BCC), bao gồm hơn 20 loài gần gũi về mặt di truyền, đã và đang nổi lên như những tác nhân cơ hội quan trọng trong lâm sàng, đặc biệt ở các bệnh nhân suy giảm miễn dịch, bệnh nhân xơ nang phổi và đơn vị hồi sức tích cực. Sự gia tăng các trường hợp nhiễm trùng do *Burkholderia* spp. tại bệnh viện trong những năm gần đây, đặc biệt trong các đợt bùng phát dịch khuẩn bệnh viện, đã đặt ra những thách thức lớn đối với công tác kiểm soát nhiễm khuẩn và điều trị bằng kháng sinh.

Các chủng vi khuẩn *Burkholderia* spp. không chỉ có khả năng kháng tự nhiên với nhiều nhóm kháng sinh, mà còn thường xuyên biểu hiện kiểu hình đa kháng (MDR), thậm chí kháng với các kháng sinh dự phòng như carbapenem hoặc colistin. Đặc biệt, cấu trúc di truyền phức tạp của các loài Bcc, với bộ gen lớn, giàu yếu tố di truyền di động (plasmid, transposon, integron) và khả năng hình thành màng sinh học mạnh mẽ, đã giúp các chủng vi khuẩn này thích nghi tốt trong môi trường bệnh viện và né tránh hệ miễn dịch của vật chủ. Mặc dù *Burkholderia* spp. là một nhóm vi khuẩn có tiềm năng gây bệnh nghiêm trọng, tuy nhiên, sự chưa đầy đủ về dữ liệu toàn bộ hệ gene khiến cho việc xác định cơ chế kháng thuốc và phân loại phân tử gặp nhiều khó khăn. Hiện nay, đã có một số nghiên cứu về các loài *Burkholderia* spp. tại Việt Nam, tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào công bố trình tự bộ gene hoàn thiện của các chủng BCC phân lập từ bệnh nhân người Việt Nam. Do đó, nghiên cứu này hướng tới giải trình tự toàn bộ hệ gene một số chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Burkholderia* spp., từ đó làm sáng tỏ các đặc tính di truyền quan trọng liên quan đến khả năng lây nhiễm, gây bệnh và cơ chế kháng thuốc kháng sinh của chúng. Bằng cách sử dụng các công nghệ giải trình tự toàn bộ hệ gene (WGS) kết hợp với các công cụ phân tích tin sinh học hiện đại, đã mở ra cơ hội để phân tích sâu các đặc điểm di truyền của vi khuẩn, qua đó góp phần hỗ trợ chẩn đoán, điều trị và kiểm soát nhiễm khuẩn hiệu quả hơn.

Xuất phát từ thực tiễn trên, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu giải trình tự toàn bộ hệ gene của một số chủng vi khuẩn *Burkholderia* spp. phân lập tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 trong giai đoạn 2020–2021. Chúng tôi ứng dụng công nghệ giải trình tự hệ gen thế hệ mới (NGS), trên cơ sở dữ liệu gene thu được, tiến hành phân tích tin sinh các yếu tố liên quan đến kiểu hình kháng kháng sinh, độc lực và khả năng gây bệnh, nhằm làm sáng tỏ các đặc điểm sinh học phân tử quan trọng của nhóm vi khuẩn BCC đang lưu hành tại Việt Nam. Dữ liệu này không chỉ giúp nâng cao hiểu biết về dịch tễ học phân tử của *Burkholderia* spp., mà còn cung cấp cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng trong kiểm soát nhiễm khuẩn và phát triển phác đồ điều trị hiệu quả hơn trong tương lai. Bên cạnh đó, nghiên cứu của chúng tôi đã lần đầu tiên xác định được trình tự bộ gene hoàn thiện chủng *B. cenocepacia* 862 có kiểu gene mới chưa từng được công bố trước đó. Do đó, bộ gene của chủng này có thể được sử dụng làm bộ gene tham chiếu trên ngân hàng GenBank, NCBI, phục vụ các nghiên cứu tiếp theo.

Mục tiêu của đề tài

Giải trình tự toàn bộ hệ gene và xác định đặc điểm phân tử liên quan đến kháng kháng sinh, độc lực và khả năng lây nhiễm, gây bệnh của một số chủng vi khuẩn *Burkholderia* spp. phân lập tại Bệnh viện 108 giai đoạn 2020 - 2021.

Nội dung nghiên cứu

- Nội dung 1: Giải trình tự và phân tích đặc điểm bộ gene các chủng vi khuẩn.
- Nội dung 2: Xác định gene kháng kháng sinh và cơ chế kháng thuốc kháng sinh.
- Nội dung 3: Xác định gene độc lực và sự tương tác gene.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TỔNG QUAN VỀ PHỨC HỢP VI KHUẨN *BURKHODELRIA CEPACIA* (BCC)

1.1.1. Đặc điểm chung và phân bố của nhóm BCC

B. cepacia complex (BCC) là một nhóm trực khuẩn Gram âm không lên men bao gồm 20 loài khác nhau, trong đó các loài điển hình gồm *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis*, *B. stableis*, *B. ambifaria*, *B. dolosa*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia* và *B. ubonensis*, v.v. [1, 2, 3]. Trước những năm 1990, BCC chỉ được biết đến như một loài là *B. cepacia*. Ngay cả trước đó *B. cepacia* cũng được coi là *Pseudomonas cepacia* khi nó lần đầu tiên được phân lập ở bệnh nhân xơ nang vào năm 1977 [4]. Vào giữa những năm 1990, các nhà khoa học ghi nhận rằng trên thực tế, *B. cepacia* bao gồm nhiều phân nhóm riêng biệt và năm genovars ban đầu đã được xác định: *B. cepacia* (genomovar I), *B. multivorans* (genomovar II), *B. cenocepacia* (genomovar III), *B. Stableis* (genomovar IV), *B. vietnamiensis* (genomovar V) [5, 6, 7]. Nhóm tác nhân gây bệnh này thường được tìm thấy trong môi trường tự nhiên như đất, nước, cây trồng và sinh trưởng tốt trong môi trường ẩm ướt có hàm lượng nhỏ chất dinh dưỡng. Ngoài ra, chúng có khả năng thích ứng đa dạng với cả những môi trường nhân tạo nhờ tính linh hoạt của kiểu gene và kiểu hình, cho phép đột biến để tồn tại trong điều kiện khó khăn. Mặc dù BCC được tìm thấy ở mọi quốc gia và châu lục trên thế giới, các trường hợp nhiễm khuẩn *Burkholderia* spp. được báo cáo phổ biến hơn ở các quốc gia nhiệt đới và cận nhiệt đới như Khu vực Đông Nam Á, Châu Úc, Châu Nam Mỹ. Sự phát triển và đa dạng di truyền của *Burkholderia* spp. được xác định là theo cơ chế tiến hóa theo dòng. Do đó đặc điểm di truyền của chúng rất đặc trưng cho từng khu vực địa lý, từng quốc gia và hệ sinh thái cụ thể.

1.1.2. Tính cấp thiết của bệnh gây ra bởi BCC

BCC là tác nhân gây bệnh cơ hội nghiêm trọng ở bệnh nhân bệnh nặng và bị suy giảm miễn dịch, xơ nang, bệnh u hạt mãn tính. Nhóm phức hợp khuẩn Gram âm này cũng là tác nhân gây nhiễm trùng bệnh viện quan trọng ở bệnh nhân nhập viện, nhiễm trùng vết thương sau phẫu thuật, viêm phổi, nhiễm trùng đường

tiết niệu, nhiễm trùng đường hô hấp và nhiễm trùng máu đe dọa tính mạng. Bệnh nhân xơ nang mắc BCC gần như không thể điều trị dứt điểm vi khuẩn do chúng có thể tồn tại trong môi trường phổi, gây ra những kết quả khó lường, bao gồm viêm phổi hoại tử gây tử vong (hội chứng cepacia). Phức hợp *Burkholderia cepacia* là một nhóm vi khuẩn gây bệnh cơ hội, ẩn chứa nguy cơ đáng kể cho sức khỏe con người, đặc biệt là những người có hệ miễn dịch suy yếu hoặc mắc các bệnh mãn tính như xơ nang. BCC bao gồm nhiều loài có quan hệ gần nhau, gây ra một loạt các bệnh nhiễm trùng với mức độ nghiêm trọng khác nhau.

Trong số các bệnh gây bởi do BCC, nhiễm trùng phổi là phổ biến nhất, đặc biệt ở bệnh nhân xơ nang. BCC có thể xâm nhập vào đường hô hấp và gây ra viêm nhiễm, dẫn đến các triệu chứng như ho, sốt, khó thở và sản xuất đờm. Trong trường hợp nghiêm trọng, bệnh lý viêm có thể tiến triển nặng và đe dọa tính mạng người mắc. Ngoài ra, BCC còn có khả năng gây nhiễm trùng máu, một tình trạng nguy hiểm đến tính mạng, đặc biệt ở những người có hệ miễn dịch suy yếu như bệnh nhân ung thư hoặc đang điều trị bằng thuốc ức chế miễn dịch. BCC cũng gây ra các bệnh khác như nhiễm trùng da và mô mềm, mắt và viêm nhiễm xương khớp. Tính cấp thiết của các bệnh nhiễm trùng do BCC nằm ở khả năng kháng thuốc cao của chúng. BCC vốn có khả năng kháng lại nhiều loại kháng sinh thông thường, khiến việc điều trị trở nên khó khăn và phức tạp. Điều này làm tăng nguy cơ biến chứng và tử vong do nhiễm trùng, đặc biệt ở những bệnh nhân có sức khỏe yếu. Một số chủng BCC có khả năng lây truyền cao giữa người với người, nhất là khi mà ở trong cái môi trường bệnh viện. Điều này có thể dẫn đến các đợt bùng phát dịch bệnh, gây ra mối đe dọa nghiêm trọng cho sức khỏe cộng đồng.

Còn với bệnh nhân xơ nang, nhiễm trùng mạn tính do BCC có thể gây suy giảm chức năng phổi, ảnh hưởng lâu dài đến chất lượng cuộc sống và tiên lượng của bệnh nhân. Bệnh nhiễm trùng do BCC gây ra lo ngại nhiều với sức khỏe cộng đồng, đặc biệt trong bối cảnh gia tăng tình trạng không dung nạp kháng sinh. Việc nghiên cứu và phát triển các biện pháp phòng ngừa, chẩn đoán và điều trị hiệu quả hơn đối với phức hợp vi khuẩn này là rất cần thiết để bảo vệ sức khỏe của cộng đồng và cải thiện chất lượng cuộc sống cho những người bị ảnh hưởng bởi mầm bệnh này.

1.2. PHÂN LOẠI, ĐỊNH DANH VÀ ĐIỀU TRỊ NHIỄM KHUẨN BCC

1.2.1. Các phương pháp chẩn đoán và thử thách

Trong nhóm BCC, *B. cenocepacia* và *B. multivorans* là hai loài gây bệnh phổ biến nhất. Trong những năm gần đây, sự xuất hiện liên tục các trường hợp bị nhiễm khuẩn này ở những bệnh nhân xơ nang cho thấy sự tiếp nhận từ các nguồn không phải của con người, chẳng hạn như môi trường tự nhiên. Điều kiện môi trường hoặc vật chủ không phải con người, trong đó các yếu tố độc lực có thể thích nghi, chọn lọc các tính trạng tạo độc lực và do đó môi trường tự nhiên có thể là ổ chứa các mầm bệnh cơ hội. Phức hợp BCC có khả năng tồn tại trong môi trường ẩm ướt kéo dài và lây truyền từ người sang người trong các cơ sở dịch vụ lâm sàng, gây phức tạp trong việc chữa trị và đòi hỏi kiểm soát nhiễm khuẩn nghiêm ngặt. Hiện nay, các phương pháp dùng để chẩn đoán có thể kể đến như nuôi cấy vi khuẩn, định danh dựa trên các tính chất sinh vật hóa học, các phương pháp phân tử, giải trình tự và phân tích khối phổ. Một nghiên cứu hồi cứu đã thực hiện tại BV Nhân Dân Gia Định năm 2009 chỉ ra các ca mắc khó điều trị, khả năng tử vong cao và tỷ lệ kháng thuốc cao với các loại như amoxicillin, amoxicillin+a, clavulanic, cephalosporins thế hệ 1 – 3 và aminoglycosides [8]. Mặc dù thông tin về các nghiên cứu về *Burkholderia cepacia* complex tại Việt Nam có thể không nhiều và cập nhật như ở các nước phát triển, một số nghiên cứu đã được thực hiện và cung cấp những hiểu biết quan trọng về sự hiện diện và tác động của BCC tại Việt Nam. Ngoài ra, một số nghiên cứu đáng chú ý như nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết do vi khuẩn *Burkholderia cepacia* tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Thái Bình năm 2016-2020, điều tra đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân nhiễm trùng huyết do *B. cepacia*, nhấn mạnh mức độ nghiêm trọng của nhiễm trùng này và sự cần thiết của việc chẩn đoán và điều trị kịp thời [9]. Các nghiên cứu khác đã được thực hiện để điều tra tỷ lệ hiện mắc của BCC ở bệnh nhân xơ nang, đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng BCC phân lập được, và tác động của nhiễm trùng BCC đối với kết quả lâm sàng của bệnh nhân.

Tỷ lệ hiện mắc BCC, mặc dù chưa có số liệu chính xác trên toàn quốc, các nghiên cứu chỉ ra rằng BCC có mặt ở một tỷ lệ đáng kể bệnh nhân xơ nang tại Việt Nam. Các chủng BCC phân lập được thường kháng với nhiều loại kháng sinh, gây khó khăn trong điều trị. Hơn nữa, nhiễm trùng BCC có thể gây ra các biến chứng nghiêm trọng, bao gồm viêm phổi nặng, nhiễm trùng huyết và suy giảm chức năng phổi, ảnh hưởng đáng kể đến chất lượng cuộc sống và tiên lượng của bệnh nhân. Phức hợp vi khuẩn này cần được nghiên cứu thêm quy mô lớn hơn

để xác định chính xác tỷ lệ hiện mắc và các yếu tố nguy cơ liên quan đến nhiễm trùng BCC tại Việt Nam. Cần áp dụng các kỹ thuật phân tử tiên tiến như MLST và giải trình tự toàn bộ hệ gene để định danh chính xác các loài và kiểu gene BCC, từ đó hiểu rõ hơn về sự đa dạng di truyền và dịch tễ học của chúng, cũng như nghiên cứu sâu hơn về cơ chế kháng thuốc và độc lực của các chủng BCC lưu hành tại Việt Nam để phát triển các chiến lược điều trị và phòng ngừa hiệu quả hơn. Các phương pháp chẩn đoán nhanh chóng và chính xác hơn cũng cần được phát triển và nghiên cứu, cũng như các liệu pháp điều trị mới, bao gồm cả liệu pháp phage, để đối phó với tình trạng kháng kháng sinh ngày càng gia tăng.

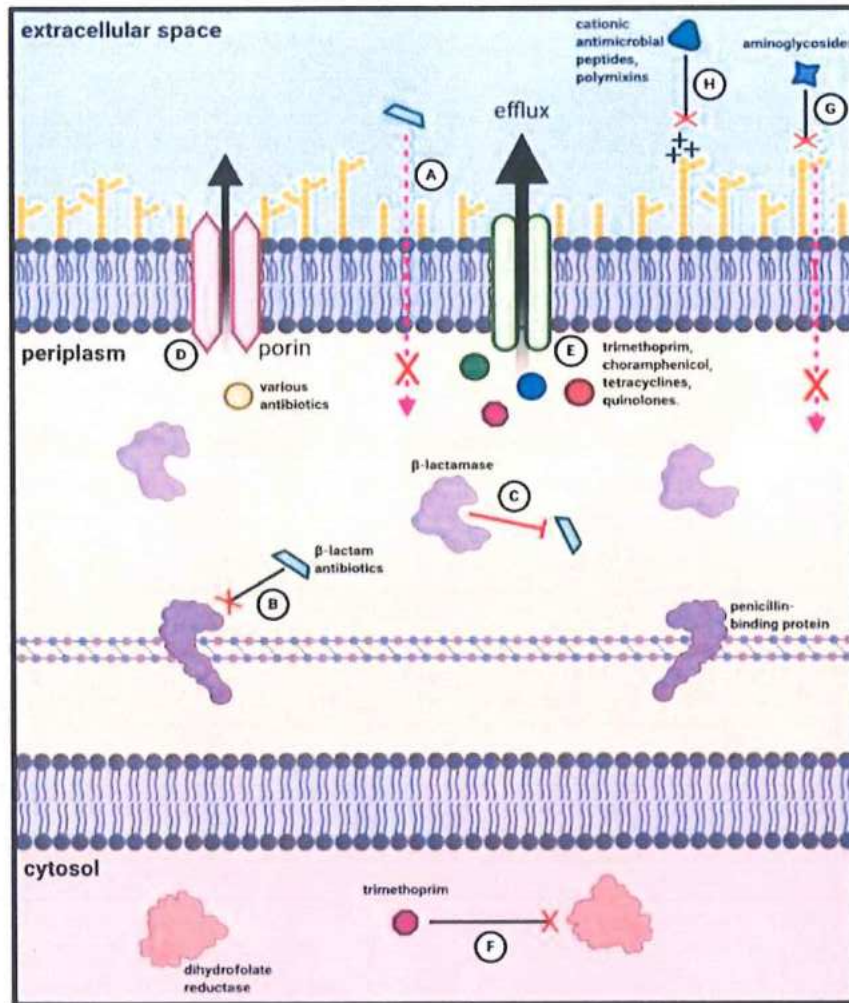
1.2.2. Phương pháp điều trị và kháng kháng sinh của BCC

BCC là một nhóm vi khuẩn được biết đến với khả năng kháng lại nhiều loại kháng sinh có liên quan đến trong điều trị lâm sàng và khả năng gây nhiễm trùng, đặc biệt ở những người mắc bệnh xơ nang (CF). Các loài BCC có đặc tính kháng tự nhiên với nhiều loại thuốc kháng sinh bao gồm β -lactam, fluoroquinolone, aminoglycoside, polymyxin, và cationic peptide. Đây là thách thức lớn nhất trong điều trị các trường hợp viêm phổi do BCC gây ra. Trước tiên, nhờ khả năng ngăn tính thấm qua màng tế bào mà rất nhiều loại kháng sinh không thể vượt qua lớp hàng rào bảo vệ này, dẫn đến không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn. Đa số các loài thuộc nhóm BCC chứa các lipopolysaccharide bị biến đổi làm cho chúng kháng với nhóm polymyxin, trong đó gồm cả colistin. Bên cạnh đó, sự xuất hiện của các kênh protein xuyên màng cũng như rất nhiều hệ thống bơm thải đa thuốc thuộc nhóm resistance-nodulation-cell division (RND) superfamily đã đóng vai trò rất quan trọng đối với khả năng kháng thuốc tự nhiên của các loài thuộc BCC. Nghiên cứu gần đây cho thấy một số loài vi khuẩn thuộc BCC mang từ 11 – 16 bơm thải hydrophobic/amphiphile efflux 1 (HAE1)-RND pumps chịu trách nhiệm kháng đa thuốc. Nghiên cứu khác cũng chỉ ra các cơ chế khác nhau của kiểu hình kháng kháng sinh của phức hợp *Burkholderia cepacia* (Hình 1.1). Đối với kháng sinh β -lactam, chúng sử dụng sự kết hợp của việc giảm tính thấm màng ngoài, đột biến protein gắn penicillin và sản xuất β -lactamase. Cơ chế bơm đẩy và porin giúp BCC kháng lại nhiều loại thuốc khác, bao gồm trimethoprim, chloramphenicol, tetracycline và một số quinolone. Đột biến dihydrofolate reductase cũng làm tăng khả năng kháng trimethoprim. Ngoài ra, BCC còn có khả năng kháng aminoglycoside và polymyxin nhờ sự sửa đổi LPS và giảm điện tích âm trên màng

ngoài. Sự đa dạng và phức tạp của các cơ chế kháng kháng sinh này khiến việc điều trị nhiễm trùng BCC trở nên khó khăn [10].

Khả năng kháng đa thuốc và sự thích nghi cao của BCC khiến việc điều trị trở nên khó khăn và phức tạp. Hiện tại, chưa có thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên nào đánh giá hiệu quả của các phác đồ điều trị kháng sinh khác nhau cho bệnh nhân nhiễm BCC, khiến việc lựa chọn phương pháp điều trị tối ưu trở nên khó khăn. Tuy nhiên, các bác sĩ lâm sàng thường sử dụng liệu pháp phối hợp kháng sinh để điều trị nhiễm trùng BCC. Phác đồ thường bao gồm một loại β -lactam kết hợp với một loại kháng sinh khác như fluoroquinolone, aminoglycoside hoặc co-trimoxazole. Sự kết hợp này nhằm tăng cường hiệu quả điều trị và giảm thiểu nguy cơ kháng thuốc. Đối với những bệnh nhân bị nhiễm trùng đường hô hấp, liệu pháp hấp thụ bằng cách hít qua mũi, họng có thể được sử dụng để cung cấp kháng sinh trực tiếp đến phổi. Phương pháp này giúp đạt được nồng độ thuốc cao hơn tại vị trí nhiễm trùng, đồng thời giảm thiểu tác dụng phụ toàn thân. Ngoài các phương pháp điều trị truyền thống, liệu pháp phage cũng đang được nghiên cứu như một giải pháp thay thế tiềm năng cho các bệnh nhiễm trùng BCC kháng thuốc. Liệu pháp phage sử dụng virus bacteriophage đặc hiệu để tiêu diệt vi khuẩn BCC, mang lại hy vọng như một phương thức điều trị mới cho những bệnh nhân không đáp ứng với kháng sinh thông thường.

Các nhà nghiên cứu cũng đang tích cực tìm kiếm các liệu pháp mới để điều trị nhiễm trùng BCC. Các chất ức chế bơm đẩy, nhắm vào cơ chế kháng thuốc quan trọng của BCC, và các liệu pháp nhắm mục tiêu các yếu tố độc lực của BCC cũng đang được phát triển và thử nghiệm. Việc lựa chọn phương pháp điều trị tối ưu cho từng bệnh nhân phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm loại nhiễm trùng, tình trạng sức khỏe của bệnh nhân, kiểu kháng kháng sinh của chủng BCC gây bệnh và khả năng dung nạp thuốc của bệnh nhân. Do khả năng kháng thuốc ngày càng tăng của BCC, việc nghiên cứu và phát triển các liệu pháp điều trị mới và hiệu quả hơn là rất cần thiết. Các thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên đa trung tâm sẽ đóng vai trò quan trọng trong việc đánh giá hiệu quả của các phác đồ kháng sinh khác nhau và xác định các yếu tố như thời gian điều trị tối ưu, tỷ lệ tác dụng phụ và kết quả lâu dài. Sự hiểu biết sâu sắc về cơ chế kháng thuốc của BCC và các thử nghiệm lâm sàng chặt chẽ sẽ là chìa khóa để cải thiện kết quả điều trị cho bệnh nhân [11].



Hình 1.1. Các cơ chế kháng kháng sinh của BCC. Khả năng kháng kháng sinh β -lactam do sự giảm tính thấm màng (A), protein gắn penicillin (B) bị đột biến và β -lactamase được mã hóa nhiễm sắc thể (C). Đùn thông qua porins (D) và bơm xả (E) chịu trách nhiệm kháng một số lượng lớn các hợp chất, bao gồm trimethoprim, chloramphenicol, tetracycline và một số quinolone, đột biến dihydrofolate reductase cung cấp thêm khả năng kháng trimethoprim (F). Ở màng ngoài, các sửa đổi LPS ngăn chặn sự liên kết của aminoglycoside và do đó ngăn chặn việc vận chuyển các hợp chất này vào tế bào (G), trong khi điện tích âm giảm của màng ngoài làm giảm sự liên kết của polymyxin và peptide kháng khuẩn cation (H)[10].

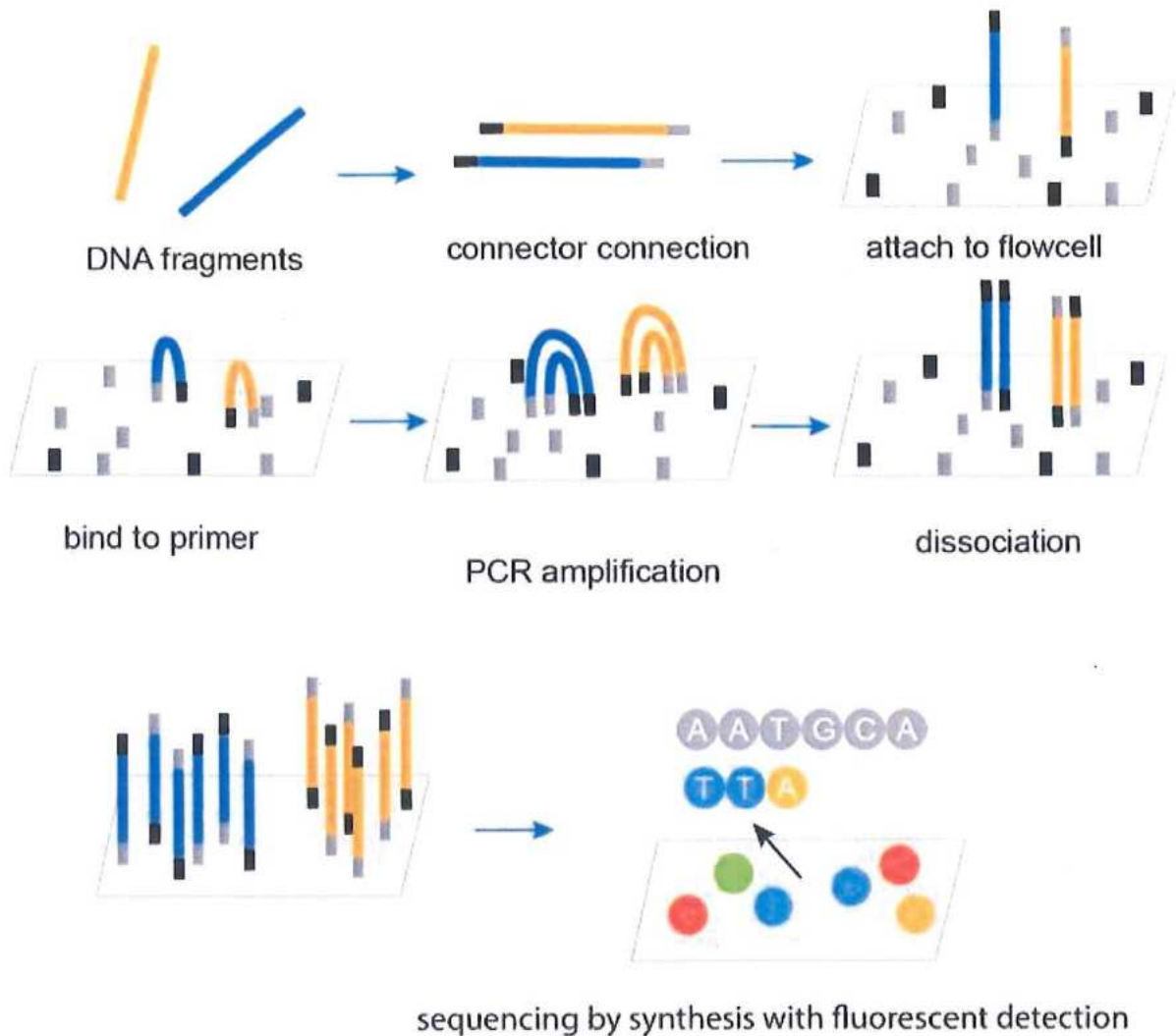
1.3. GIẢI MÃ HỆ GENE BCC BẰNG CÔNG NGHỆ GIẢI TRÌNH TỰ GENE THỂ HỆ MỚI (NGS)

1.3.1. Tổng quan công nghệ giải trình tự hệ gene thể hệ mới (NGS) Illumina

Công nghệ giải trình tự NGS được sử dụng cho việc giải trình tự một thông lượng lớn DNA hoặc RNA. Không giống công nghệ giải trình tự truyền thống như của Sanger, NGS cho phép giải hàng triệu đoạn DNA nhỏ đồng thời khiến nó trở thành một quy trình có thông lượng cao hơn. Công nghệ giải trình tự song song quy mô lớn này mang lại thông lượng, khả năng mở rộng và tốc độ cực cao, do đó cho phép các nhà nghiên cứu xác định thứ tự các nucleotide trong toàn bộ trình tự gene hoặc vùng mục tiêu của DNA hoặc RNA [12]. NGS hữu ích trong chẩn đoán lâm sàng, y học cá nhân hóa và sinh học, giúp cung cấp thông tin đầy đủ về các biến thể di truyền, đột biến và sắp xếp lại cấu trúc. Đó là lý do tại sao NGS đã trở thành một công cụ vô giá trong việc giúp các nhà nghiên cứu đào sâu về thông tin di truyền, cũng như ứng dụng của nó trong y học vì nhiều mẫu có thể được giải trình tự đồng thời, cung cấp các công cụ tin sinh học tiên tiến để phân tích dữ liệu.

NGS đã ngày càng phổ biến hơn, không giới hạn chỉ trong lĩnh vực nghiên cứu y sinh mà còn được áp dụng trong thực tiễn lâm sàng giải trình tự toàn bộ hệ gene WGS của vi khuẩn gây bệnh. Công nghệ Illumina đã cách mạng hóa việc giải trình tự toàn bộ bộ gene của vi khuẩn gây bệnh bằng cách tăng thông lượng theo cấp số nhân so với giải trình tự Sanger thế hệ đầu tiên. Ngoài ra, công nghệ Illumina cung cấp thông lượng cao, tạo ra hàng triệu đến hàng tỷ lượt giải trình tự đoạn ngắn, thường có độ dài từ 100 đến 300 bp với độ chính xác rất cao. Hình 3.2 minh họa công nghệ của NGS Illumina, sử dụng công nghệ giải trình tự bằng tổng hợp với phát hiện huỳnh quang. Đầu tiên, các đoạn DNA được phân mảnh và gắn đầu nối đặc hiệu. Sau đó, chúng được gắn vào flowcell và khuếch đại bằng PCR để tạo thành các cụm chứa nhiều bản sao giống hệt nhau. Tiếp theo, quá trình giải trình tự diễn ra bằng cách thêm các nucleotide được đánh dấu huỳnh quang vào flowcell. Khi một nucleotide kết hợp vào chuỗi DNA, tín hiệu huỳnh quang tương ứng được ghi lại. Sau đó, chất đánh dấu huỳnh quang được loại bỏ để chuẩn bị cho việc kết hợp nucleotide tiếp theo. Quá trình này được lặp lại nhiều lần để xác định trình tự của toàn bộ đoạn DNA. Cuối cùng, dữ liệu hình ảnh được xử lý và

phân tích để chuyển đổi tín hiệu huỳnh quang thành trình tự DNA, sau đó được sắp xếp và phân tích để tìm kiếm các thông tin sinh học quan trọng.



Hình 1.2. Các bước giải trình tự thế hệ mới (NGS) Illumina [12].

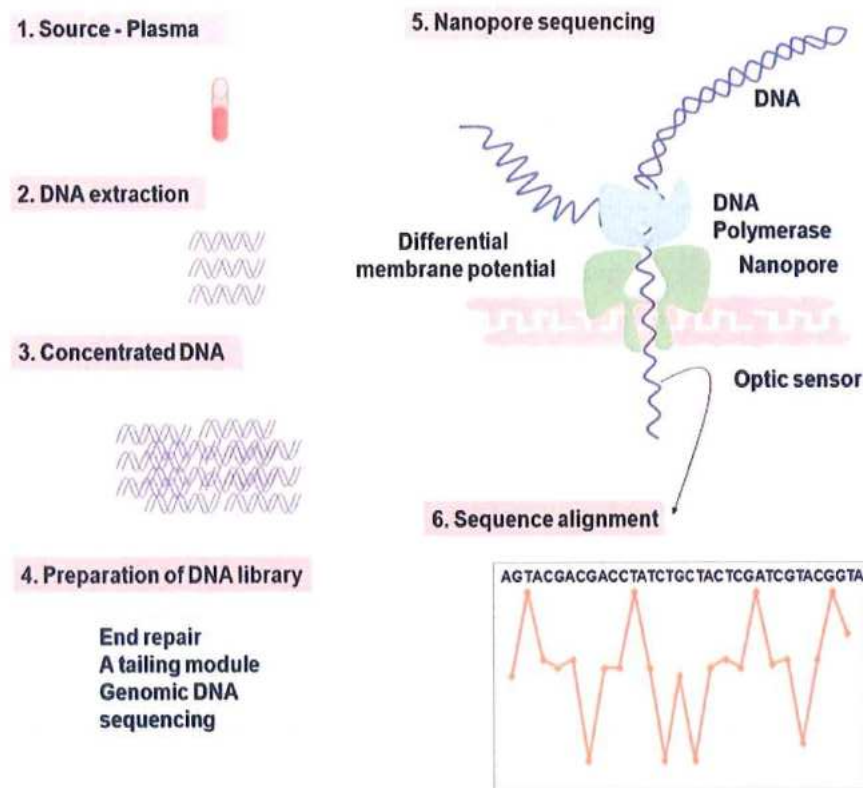
1.3.2. Công nghệ giải trình tự toàn bộ hệ gene (WGS) Nanopore

Đọc trình tự đoạn ngắn đặt ra những thách thức trong việc giải quyết các vùng lặp đi lặp lại, các biến thể cấu trúc và giai đoạn haplotype gây ra một số hạn chế của nó đối với một số phân tích bộ gene nhất định. Giải trình tự đoạn dài bằng công nghệ Nanopore, các phân tử DNA sẽ đi qua các lỗ có kích thước nano được gắn trên màng polymer không dẫn điện. Sự biến đổi của dòng điện khi các phân tử đi qua sẽ được phiên giải ra trình tự DNA trong thời gian thực, tạo ra các trình tự đoạn dài từ hàng trăm tới hàng chục nghìn bp [13, 14]. Quá trình được mô tả chi tiết ở Hình 1.3 này bắt đầu bằng việc tạo ra một lỗ nano siêu nhỏ trên một

màng mỏng, đủ lớn để một sợi DNA đơn có thể luồn qua. Sau đó, một điện trường được thiết lập để tạo ra dòng ion chảy qua lỗ nano này. Khi sợi DNA đi qua lỗ nano, mỗi nucleotide (A, T, C, G) sẽ gây ra một sự thay đổi đặc trưng trong dòng ion. Những thay đổi này được đo lường và ghi lại cẩn thận. Bằng cách phân tích các tín hiệu điện này, chúng ta có thể giải mã trình tự chính xác của các nucleotide trong sợi DNA. Công nghệ Nanopore sequencing hứa hẹn mang lại một phương pháp giải trình tự DNA nhanh chóng, tiết kiệm chi phí và có tính di động cao, mở ra nhiều cơ hội mới trong lĩnh vực nghiên cứu và ứng dụng di truyền. WGS Nanopore cho phép phân giải các vùng gene phức tạp, phát hiện các biến thể cấu trúc và tạo điều kiện cho quá trình lắp ráp de novo nhưng sẽ có tỷ lệ lỗi cao hơn. Việc kết hợp đọc trình tự đoạn ngắn Illumina và đọc trình tự đoạn dài Nanopore sẽ cung cấp một cách tiếp cận mang tính tổng thể vừa có độ chính xác và phạm vi bao phủ cao, vừa có thể giải quyết được các vấn đề về phát hiện và phân tích các cấu trúc phức tạp và các biến thể gene [15, 16].

WGS đang là công cụ hữu hiệu nhất trong điều tra và kiểm soát tình trạng phát tán vi khuẩn kháng thuốc, đối phó với các đợt bùng phát, kiểm soát ổ dịch và xác định chuỗi lây nhiễm. WGS cung cấp đầy đủ thông tin dịch tễ học phân tử, đặc tính chủng loài, kiểu gene liên quan đến kháng thuốc làm cơ sở phát triển các công cụ xét nghiệm mới giúp chẩn đoán nhanh các chủng kháng thuốc. Giải trình tự bộ gene còn cung cấp thông tin các yếu tố di truyền di động (plasmid, phage, transposomes), sự tiến hóa kháng thuốc qua cơ chế chuyển gene ngang (thu nhận plasmids kháng thuốc, tái tổ hợp gene, trình tự chèn...), khả năng gây bệnh biến thể cấu trúc (sao chép, đảo đoạn) và khám phá các gene quan trọng liên quan đến đặc tính sinh tồn, cạnh tranh, đối kháng vi sinh, chuyển từ trạng thái nhạy cảm sang kháng thuốc. Bên cạnh đó, WGS cũng đưa ra thông tin các cơ chế, đích phân tử mới để nghiên cứu phát triển thuốc kháng sinh mới. Việc áp dụng WGS để giám sát toàn cầu có thể cung cấp thông tin về sự xuất hiện sớm và lan rộng của AMR và thông tin thêm cho việc phát triển chính sách kịp thời về kiểm soát AMR [17, 18].

Nanopore sequencing



Hình 1.3. Các bước trong giải trình toàn bộ hệ gene (WGS) Nanopore [16].

1.3.3. Đặc điểm hệ gene nhóm phức hợp khuẩn Gram-âm BCC

B. cepacia không phải là một loài đơn lẻ nên được đặt tên là *B. cepacia* complex, bao gồm nhiều loài vi khuẩn có đặc tính giống nhau về kiểu hình nhưng khác biệt về mặt di truyền. Hệ gene của BCC phức tạp và dễ dàng thích ứng thông qua đột biến, có kích thước từ 6-9 Mb và có 3 chromosomes. Trình tự 16S rDNA khi thực hiện so sánh trong nhóm BCC thể hiện độ tương đồng > 97,7%, và < 97% khi so sánh với các loài khác [18]. Hiện nay, với sự ra đời của công nghệ giải trình tự NGS, ngày càng nhiều các trình tự gene hoàn chỉnh của vi khuẩn trong nhóm BCC đã được công bố [19, 20, 21]. Điều này tạo cơ hội lý tưởng để kiểm tra lại phân loại của BCC bằng các phương pháp phân tử truyền thống. Ngoài ra, toàn bộ dữ liệu giải trình tự bộ gene cho phép chúng ta xác định chính xác loài gây bệnh cũng như hiểu biết rõ hơn về quá trình tiến hóa di truyền của chúng. Hệ gene của phức hợp *Burkholderia cepacia* thể hiện một số đặc điểm nổi bật, góp

phần vào khả năng thích nghi, độc lực và sự đa dạng của chúng, ngoài các gene kháng kháng sinh. Các loài trong BCC thể hiện sự đa dạng di truyền đáng kể, phản ánh khả năng thích nghi với nhiều môi trường sống khác nhau. Sự đa dạng này phát sinh từ các cơ chế như tái tổ hợp, chuyển gene ngang và đột biến, cho phép BCC phát triển và tồn tại trong nhiều môi trường khác nhau. Hệ gene BCC chứa nhiều đảo bộ gene, là các đoạn DNA lớn có thể được chuyển ngang giữa các vi khuẩn. Các đảo này thường mang các gene mã hóa cho các chức năng đặc biệt, như khả năng chuyển hóa các hợp chất cụ thể hoặc các yếu tố độc lực, giúp BCC thích nghi với các điều kiện môi trường mới và tăng cường độc lực của chúng. Hệ gene BCC chứa nhiều gene mã hóa cho các enzyme tham gia vào các con đường chuyển hóa đa dạng, cho phép chúng sử dụng nhiều nguồn carbon và năng lượng khác nhau. Điều này góp phần vào khả năng thích nghi của BCC với các môi trường sống khác nhau, bao gồm cả môi trường trong cơ thể người.

Các nghiên cứu về hệ gene của BCC đã chỉ ra rằng chuyển gene ngang (horizontal gene transfer - HGT) đóng một vai trò quan trọng trong khả năng thích nghi và tiến hóa của chúng. Mặc dù các bài báo không đi sâu vào chi tiết cụ thể về từng cơ chế HGT, chúng cung cấp một số bằng chứng và thảo luận về vai trò của HGT trong BCC. Các đảo bộ gene (genomic islands - GIs) là các đoạn DNA lớn có thể được chuyển ngang giữa các vi khuẩn. Chúng thường mang các gene mã hóa cho các chức năng đặc biệt, như khả năng chuyển hóa các hợp chất cụ thể hoặc các yếu tố độc lực. Sự hiện diện của nhiều đảo bộ gene trong hệ gene BCC cho thấy HGT đã đóng một vai trò quan trọng trong quá trình tiến hóa của chúng. Ví dụ, Saroha và cộng sự (2023) báo cáo rằng đảo bộ gene GI15, mang các gene liên quan đến độc lực, chỉ có ở một số chủng BCC nhất định, cho thấy nó có thể đã được thu nhận thông qua HGT [22, 23]. Plasmid là các phân tử DNA ngoại nhiễm sắc thể, có khả năng tự tái bản và có thể mang nhiều gene khác nhau, bao gồm cả các gene kháng kháng sinh và độc lực. Hệ gene BCC chứa nhiều plasmid, và sự trao đổi plasmid giữa các vi khuẩn có thể tạo điều kiện cho HGT. Nghiên cứu cũng đề cập rằng một số chủng BCC mang plasmid mã hóa cho hệ thống tiết type IV, có thể liên quan đến khả năng kháng kháng sinh và độc lực. Bacteriophage (hay phage) là virus lây nhiễm vi khuẩn. Phage có thể đóng vai trò là phương tiện chuyển gene giữa các vi khuẩn thông qua quá trình tải nạp (transduction). Sự hiện diện của nhiều phage trong hệ gene BCC, cho thấy phage

có thể đóng vai trò trong HGT ở BCC, một số chủng BCC cũng được phát hiện đã thu nhận phage ST79 từ *Burkholderia pseudomallei* thông qua HGT [23].

Zhou và cộng sự (2020) cho thấy tái tổ hợp tương đồng, quá trình trao đổi vật liệu di truyền giữa các phân tử DNA, đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì sự gắn kết di truyền và tăng cường sự tương đồng giữa các loài trong BCC. Tái tổ hợp có thể tạo điều kiện cho HGT bằng cách tích hợp DNA ngoại lai vào hệ gene của vi khuẩn. Các cơ chế HGT có thể bao gồm: Biến nạp (Transformation): Vi khuẩn hấp thụ DNA tự do từ môi trường xung quanh; Tải nạp (Transduction): DNA được chuyển từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác thông qua phage; Tiếp hợp (Conjugation): DNA được chuyển trực tiếp giữa hai vi khuẩn thông qua một cấu trúc gọi là pilus. HGT cho phép BCC nhanh chóng có được các đặc điểm mới, chẳng hạn như khả năng kháng kháng sinh và độc lực, giúp chúng thích nghi và tồn tại trong các môi trường khác nhau, bao gồm cả môi trường bệnh viện và cơ thể người [22, 23].

1.3.4. Các cụm gene gây bệnh (virulence) và kháng kháng sinh (AMR) đã được nghiên cứu

Kiểu hình kháng kháng sinh và gây độc lực ở BCC là do nhiều yếu tố và liên quan đến một số gene do giữa chúng có những hệ thống giao tiếp Quorum Sensing (QS) khác nhau, kích thích cơ chế bảo vệ như tiết ra các yếu tố gây độc và màng sinh học. khi thực hiện xâm lấn và chiếm tế bào vật chủ. Hệ thống QS phụ thuộc vào sự tổng hợp và phản ứng với N-acyl hóa homoserine lacton (AHL) thuộc họ protein LuxI là phổ biến nhất của vi khuẩn Gram-âm. Các nghiên cứu gần đây sử dụng phương pháp omics đã giúp làm sáng tỏ các chiến lược thích ứng in vivo và biểu hiện điều hòa gene độc lực của vi khuẩn BCC khi lây nhiễm sang vật chủ là người. Eiseul và cộng sự năm 2023 đã phân tích được 79 gene độc lực đầy hứa hẹn ở chủng *B. contaminans* SK875, trong đó có những gene đã được xác định chức năng bám dính tế bào vật chủ (boaA, boaB, Type IV pili), chức năng tạo vỏ và lông mao liên quan tới tính nhu động và xâm lấn, sản sinh phân tử AHL QS và điều khiển chức năng tế bào vật chủ (cepIR, BsaT3SS) [11].

Đối với kháng kháng sinh, các đột biến ở gene điều hòa bơm dòng chảy RND-3 góp phần chủ yếu vào hoạt động của bơm dòng chảy, dẫn đến khả năng kháng thuốc kháng sinh. Bộ gene BCC cũng mã hóa nhiều con đường kháng kháng sinh, bao gồm bơm thoát ra ngoài và cơ chế biến đổi/phân hủy kháng sinh.

Một nghiên cứu cho thấy tình trạng kháng thuốc tự phát ở *B. cenocepacia* liên quan đến nhiều thay đổi biểu hiện gene và các tập hợp gene khác nhau hơn so với những gene bị kích thích do tiếp xúc với nồng độ dưới mức ức chế của mỗi loại kháng sinh. Ngoài ra, việc thiếu các vị trí liên kết trên lipopolysaccharit của BCC dẫn đến tình trạng kháng thuốc nội tại đối với các thuốc chống vi trùng cation, polymyxin và aminoglycoside. Gene kháng kháng sinh và gene độc lực đều đóng vai trò quan trọng trong khả năng gây bệnh của BCC, khiến chúng trở thành một thách thức đáng kể trong môi trường lâm sàng. Cần nghiên cứu về đặc điểm phân tử, hệ gene, cơ chế kháng thuốc, cơ chế lây nhiễm và gây bệnh của BCC do chưa được nghiên cứu đầy đủ ở hầu hết các quốc gia trên thế giới.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn *Burkholderia* spp. được phân lập và tiến hành chạy định danh và kháng sinh đồ tại Khoa vi sinh, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, theo quy trình thường quy. Mức độ nhạy cảm kháng sinh (kháng thuốc, kháng trung gian và nhạy cảm) được xác định theo hướng dẫn của Viện tiêu chuẩn phòng thí nghiệm lâm sàng Mỹ (CLSI 2018). 4 chủng vi khuẩn *Burkholderia* spp. đa kháng thuốc (kháng với ít nhất 3 kháng sinh thuộc 3 nhóm thuốc khác nhau) được lựa chọn để giải trình tự toàn bộ hệ gene. Các tính chất lâm sàng của các chủng vi khuẩn được mô tả trong phần Phụ lục 1, 2.

2.1.2. Hóa chất và thiết bị

Hóa chất và thiết bị thực hiện nuôi cấy, tách chiết DNA và giải trình tự nanopore được cung cấp bởi Nhóm nghiên cứu MICH, Khoa Khoa học sự sống – Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội (USTH):

- Bộ kit tách chiết DNA Dneasy PowerLyzer Microbial kit (Qiagen, Hilden, Đức)
- Bộ kit chuẩn bị thư viện dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific, USA).
- Bộ Kit gắn mã nhanh (Rapid Barcoding Kit, SQK-RBK004), bộ flow cell R9.4.1 (FLO-MIN106D), thiết bị giải trình tự đoạn dài MinION M1k (Oxford Nanopore Technologies, Vương quốc Anh).
- Các kháng sinh (Oxoid, Vương Quốc Anh) sử dụng làm kháng sinh đồ được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu MICH, USTH.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thử nghiệm kháng sinh đồ

Các chủng BCC thu nhận đã được thử nghiệm về mức độ nhạy cảm với tác nhân kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch được mô tả trong hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Phòng thí nghiệm (CLSI) [9]. Đầu tiên, vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường TSB đến độ đục McFarland 0,5. Sau đó, một lượng nhỏ dịch huyền phù vi khuẩn được dàn đều trên đĩa thạch Mueller Hinton. Các đĩa giấy tẩm kháng sinh khác nhau được đặt lên đĩa thạch và ủ ở 37°C trong 18-24 giờ. Các kháng sinh được lựa chọn theo tiêu chuẩn CLSI và

nhóm kháng sinh được khuyến cáo cho nhóm *Burkholderia* spp. gồm: amikacine (30µg), ampicilline (10µg), fosfomycine (200µg), gentamicine (10µg), netilmicine (10µg), tobramycine (10µg), Chloramphenicol (30µg), piperacillin (30µg) + tazobactam (6µg), meropenem (10µg), ertapenem (10µg), imipenem (10µg), cephalexine (30µg), cefpodoxime proxetil (10µg), cefoxitine (30µg), cefsulodine (30µg), ceftazidime (10µg), cefepime (30µg), ciprofloxacin (5µg), levofloxacin (5µg), ofloxacin (5µg), norfloxacin (10µg), amoxicilline (20µg) + acide clavulanique (10µg), piperacilline (30µg), colistine (50µg), acide nalidixique (30µg), trimethoprim + sulfamides (25µg), aztreonam (30µg), temocilline (30µg), ticarcillin (75µg). Chúng vi khuẩn *E. coli* ATCC25922 được sử dụng làm đối chứng cho các nghiên cứu.

2.2.2. Tách chiết DNA tổng số và giải trình tự hệ gene

Chúng vi khuẩn *Burkholderia* spp. đa kháng thuốc được tuyển chọn cho nghiên cứu được giải trình tự hệ gene bằng công nghệ NGS. Khuẩn lạc thuần của các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường TSA và sử dụng làm nguyên liệu để tách chiết DNA tổng số (DNA nhiễm sắc thể và plasmids) sử dụng bộ kit DNeasy UltraClean Microbial Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Độ tinh sạch và nồng độ DNA tổng số được phân tích trên gel agarose, thiết bị đọc đa năng iDM5 và hệ thống Qubit 3.0 sử dụng bộ kit dsDNA HS. Mẫu DNA tinh sạch được sử dụng để làm nguyên liệu tạo thư viện DNA và giải trình tự công nghệ đoạn ngắn trên BGI platform, GWZHISEQ01 (Azenta, Bắc Kinh, Trung Quốc) với định dạng đọc hai đầu (paired-end) có độ dài 150 bp. Trình tự đoạn dài được thực hiện bằng Bộ Kit gắn mã nhanh (Rapid Barcoding Kit, mã số SQK-RBK004) trên flow cell R9.4.1 (FLO-MIN106D), sử dụng thiết bị MinION Mk1B tại Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội (USTH), Việt Nam. Toàn bộ quy trình giải trình tự đoạn dài được thực hiện theo quy trình của hãng Oxford Nanopore Technologies. Việc lắp ráp bộ gen de novo lại (kết hợp đoạn đọc ngắn và dài) được thực hiện bằng phần mềm Unicycler phiên bản 0.4.9, và độ đầy đủ của bộ gen sau lắp ráp được kiểm tra bằng công cụ BUSCO phiên bản 5.2.2.

2.2.3. Phân tích chất lượng dữ liệu và lắp ráp de novo hệ gene

Các dữ liệu đọc thô dạng paired-end được đánh giá chất lượng ban đầu bằng phần mềm FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>)

và sau đó được lọc chất lượng bằng công cụ Trimmomatic (phiên bản 0.39) với các tham số: SLIDINGWINDOW:4:20, LEADING:10, TRAILING:10, MINLEN:70 nhằm loại bỏ các đoạn đọc có điểm chất lượng (Phred) thấp hơn 20 [24]. Sau khi lọc, các đoạn đọc được đánh giá lại bằng FastQC để đảm bảo chất lượng đầu vào cho bước lắp ráp.

Các đoạn đọc đã được làm sạch sau đó được tiến hành lắp ráp de novo bằng bốn thuật toán khác nhau gồm: SPAdes Genome Assembler (phiên bản 3.14.1) [25] ở chế độ paired-end với các k-mer khác nhau (21, 33, 55, 77) để chọn tổ hợp k-mer tối ưu; IDBA-UD (phiên bản 2) [26]; SOAPdenovo (phiên bản 2.04) với k-mer = 63 [27]; và Megahit (phiên bản 1.1.1) [28]. Kết quả lắp ráp được phân tích bước đầu bằng bộ công cụ Emboss (phiên bản 6.6.0). Chất lượng của các bộ gene sau lắp ráp được đánh giá bằng phần mềm QUAST (phiên bản 5.0.2) [29], với đối chiếu tham chiếu là bộ gene chuẩn của chủng *Burkholderia cenocepacia* J2315 (mã số NC_011001.1, cơ sở dữ liệu GeneBank, NCBI). Bộ gene lai giữa trình tự đoạn ngắn và đoạn dài được lắp ráp bằng công cụ Unicycler.

2.2.4. Định danh phân tử, xác định kiểu gene (genotype)

Trình tự gene 16S rRNA thu nhận từ draft genome bằng công cụ Barrnap (phiên bản 0.9) được BLAST trên Genbank, NCBI để định danh loài vi khuẩn. Sau đó kiểu gene (genotype), dưới kiểu gene (subgenotype) sẽ được xác định bằng phân tích trình tự của 7 housekeeping genes (multi-locus sequence typing (MLST)) thông qua webtool PubMLST (<https://pubmlst.org/>). Các đoạn trình tự đọc được lắp ráp de novo sử dụng công cụ Unicycler v0.8.4.0 và chất lượng của bộ gene được đánh giá bằng phần mềm NanoStat v0.1.0. Để xác định loài vi khuẩn, mỗi bộ dữ liệu được phân tích bằng công cụ WIMP v3.2.1 thông qua phần mềm EPI2ME v2.52 (<https://epi2me.nanoporetech.com/user>). Bên cạnh đó, trình tự gene 16S cũng được xác định và sử dụng công cụ BLAST, NCBI để xác định loài vi khuẩn. Kiểu gene genotype cũng được xác định theo phương pháp MLST như mô tả ở trên. Cuối cùng, trình tự các bộ gene thu nhận được sẽ được đăng ký trên ngân hàng dữ liệu gene GenBank, NCBI.

2.2.5. Phân tích phát sinh chủng loài của các chủng *Burkholderia* spp. dựa trên trình tự gene lõi (core genome)

Để đánh giá mối quan hệ tiến hoá giữa các chủng *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), chúng tôi sử dụng công cụ Mashtree để xây dựng cây phát sinh dựa trên toàn bộ trình tự bộ gene (whole-genome phylogeny) của 254 bộ gene hoàn chỉnh và draft thuộc Bcc đã được công bố trên cơ sở dữ liệu NCBI tính đến ngày 12/02/2025. Dữ liệu genome được tải về định dạng FASTA từ NCBI GenBank, sau đó được chuẩn hóa và đưa vào pipeline Mashtree để tính khoảng cách di truyền (Mash distances) và xây dựng cây phát sinh. Từ cây Mashtree thu được, 50 chủng gần giống nhất với 4 chủng vi khuẩn phân lập trong nghiên cứu được chọn ra, dựa trên độ tương đồng bộ gene. Các bộ genome này được chú giải chức năng bằng công cụ Bakta (phiên bản 1.6.1) để tạo ra tập tin đầu ra định dạng GFF3. Đồng thời, các bộ genome của 4 chủng phân lập trong nghiên cứu cũng được chú giải đồng nhất bằng Bakta nhằm đảm bảo tính nhất quán trong phân tích gene lỗi.

Tất cả tập tin GFF3 được đưa vào pipeline Roary (<http://sanger-pathogens.github.io/Roary/>) để thực hiện phân tích pan-genome và xác định tập hợp các gene lỗi. Việc căn chỉnh các trình tự gene lỗi được thực hiện thông qua thuật toán MAFFT tích hợp trong Roary. Kết quả căn chỉnh được sử dụng làm đầu vào cho phần mềm Seaview để trực quan hóa và xây dựng cây phát sinh dựa trên gene lõi (core genome phylogeny) bằng phương pháp Maximum Likelihood sử dụng công cụ PhyML (phiên bản 3.0) với mô hình thay thế GTR và hỗ trợ bootstrap với 100 lần lặp để đánh giá độ tin cậy của các nhánh trên cây. Cây phát sinh được trực quan hóa và kết hợp cùng các thông tin bổ sung như kiểu trình tự (sequence type – ST), chỉ số MIC và sự hiện diện của các gene đề kháng bằng phần mềm GraphPad Prism (phiên bản 8.0.1).

2.2.6. Xác định đặc điểm phân tử liên quan đến tính kháng kháng sinh và các gene độc lực liên quan đến khả năng gây bệnh, lây nhiễm.

Để phân tích và chú giải toàn diện bộ gene hoàn chỉnh của các chủng *Burkholderia* spp., chúng tôi đã sử dụng kết hợp nhiều công cụ tin sinh học cùng các cơ sở dữ liệu được quốc tế công nhận. Xác định các gen kháng kháng sinh (antibiotic resistance genes - ARGs) được thực hiện thông qua hai công cụ chính: CARD-RGI (phiên bản 5.1.0) (Comprehensive Antibiotic Resistance Database – Resistance Gene Identifier, tại <https://card.mcmaster.ca/>) và ResFinder-3.2

(<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>). Các file FASTA sau khi lắp ráp, được tải lên và phân tích theo thông số mặc định. Công cụ RGI sử dụng mô hình dựa trên đồng nhất trình tự và chức năng sinh học để dự đoán các gen kháng thuốc đã biết, trong khi ResFinder sử dụng thuật toán BLASTn với ngưỡng đồng nhất tối thiểu là 90% và độ phủ chiều dài gen $\geq 60\%$.

Các vùng prophage tiềm năng được nhận diện thông qua công cụ PhageFinder (<http://phagefinder.sourceforge.net/>), cho phép phát hiện các cụm gene mang đặc điểm cấu trúc của phage, các gen mã hóa integrase. Các đảo gene (genomic islands), đặc biệt là các đảo liên quan đến độc lực (pathogenicity islands), được dự đoán bằng IslandViewer 4 (<http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/>) – công cụ tích hợp ba thuật toán: SIGI-HMM, IslandPath-DIMOB và IslandPick. Để tăng độ chính xác trong việc xác định các đảo độc lực, kết quả được đối chiếu bổ sung với PathogenicityFinder. Việc phát hiện các yếu tố độc lực (virulence factors) được thực hiện thông qua hai cơ sở dữ liệu chuyên biệt: VFDB (Virulence Factor Database – <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) và VICTORS (<http://www.phidias.us/victors/>). Các gene mã hóa protein dự đoán từ mỗi bộ gene được so sánh bằng thuật toán BLASTp với dữ liệu tham chiếu từ hai nguồn này. Chỉ những trình tự đạt tiêu chí $\geq 90\%$ độ đồng nhất và $\geq 70\%$ độ phủ so với gene tham chiếu được giữ lại.

Xử lý dữ liệu : Các phân tích tin sinh áp dụng điều kiện phân tích, thông số tiêu chuẩn cụ thể khuyến cáo cho từng công cụ khi thực hiện phân tích.

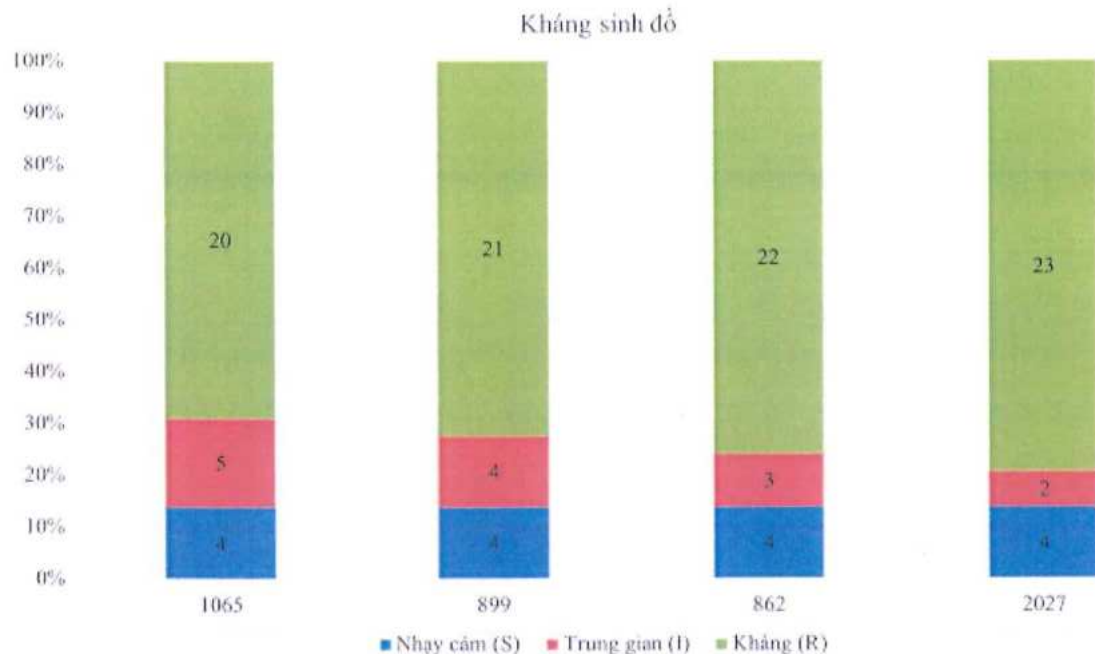
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập, định danh các chủng vi khuẩn *Burkholderia* spp.

Từ bộ sưu tập các chủng vi khuẩn đang lưu trữ tại Khoa Vi sinh, Bệnh viện Trung ương quân đội 108, thu nhận được 04 chủng vi khuẩn *Burkholderia* spp. dựa vào các đặc điểm lâm sàng (Phụ lục 1) và kết quả nuôi cấy kháng sinh đồ (Hình 3.1, Phụ lục 2). Các chủng vi khuẩn thu nhận này, đều được phân lập từ bệnh phẩm đờm của những bệnh nhân bị nhiễm khuẩn đường hô hấp và môi trường hợp sức nhiễm khuẩn gây viêm màng não.

Kết quả kháng sinh đồ cho thấy chủng *Burkholderia* spp. 1065 đã kháng với 20/29 (70%) kháng sinh thử nghiệm, chủng 899 kháng với 21/29 (72.4%), chủng *Burkholderia* spp. 862 kháng 22/29 (75.9%), và chủng *Burkholderia* spp. 2027 kháng 23/29 (79%). Cụ thể, cả 4 chủng vi khuẩn đã kháng với 20 loại kháng sinh gồm amoxicillin/clavulanic acid (20/10 μ g), chloramphenicol (30 μ g), gentamicin (10 μ g), cefotaxime (30 μ g), clindamycin (2 μ g), erythromycin (15 μ g), ertapenem (10 μ g), Nitrofurantoin (100 μ g), cefepime (30 μ g), Fosfomycin/trometamol (200UG), cefoxitin (30 μ g), imipenem (10 μ g), oxacillin (5 μ g), penicillin G (1UI), tetracycline (30 μ g), ticarcillin (75 μ g), tobramycin (10 μ g), vancomycin (5 μ g), ofloxacin (5 μ g) và pristinamycin (15 μ g). Trong khi đó chủng 899 kháng thêm meropenem (10 μ g), chủng kháng thêm meropenem và trimethoprim/sulfamethoxazole, chủng 2027 kháng thêm ciprofloxacin (5 μ g), levofloxacin (5 μ g) và norfloxacin (10 μ g). Như vậy các chủng này đều thuộc nhóm đa kháng thuốc, trong đó kháng nhiều kháng sinh thuộc thế hệ 3 và 4 là những thuốc rất quan trọng trong danh mục thuốc dự phòng như imipenem dùng để điều trị nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc. Điều này cho thấy nhiễm trùng *Burkholderia* spp. dẫn đến khả năng điều trị thành công thấp, phù hợp với các nghiên cứu trước đó khi vi khuẩn có khả năng kháng nhiều loại thuốc điều trị trong lâm sàng. Tuy nhiên, cả 4 chủng vi khuẩn này đều nhạy cảm với 4 loại kháng sinh gồm Piperacillin (100 μ g), piperacillin/tazobactam (100/10 μ g), Cefazidime (30 μ g) và Aztreonam (30 μ g). Điều này cũng phù hợp với những nghiên cứu y học gần đây cho thấy phác đồ điều trị có sử dụng các thuốc kháng sinh này có hiệu quả trong điều trị BCC [30]. Tuy nhiên tình trạng kháng các loại thuốc này ở BCC cũng đã được báo cáo. Vì vậy, việc quản lý và sử dụng thuốc kháng sinh trong điều trị BCC là hết sức quan trọng để góp phần giảm thiểu việc chọn lọc, phát tán và lây

truyền BCC kháng thuốc trong bệnh viện và trong cộng đồng. Để hiểu rõ hơn về đặc điểm di truyền và cơ chế kháng thuốc của 04 chủng *Burkholderia* đa kháng thuốc này, chúng tôi đã thực hiện giải trình tự toàn bộ gene bằng công nghệ NGS kết hợp giải trình tự đoạn ngắn và đoạn dài.



Chủng	% Nhạy cảm (S)	% Trung gian (I)	% Kháng (R)
1065	27.6% (8/29)	3.4% (1/29)	70.0% (20/29)
899	24.1% (7/29)	3.4% (1/29)	72.4% (21/29)
862	20.7% (6/29)	3.4% (1/29)	75.9% (22/29)
2027	17.2% (5/29)	3.4% (1/29)	79.3% (23/29)

Hình 3.1. Kháng sinh đồ các chủng *Burkholderia* spp.

3.2. Đặc điểm bộ gene các chủng *Burkholderia* spp.

3.2.1. Kết quả giải trình tự gene vi khuẩn

Đối với trình tự đoạn ngắn, sau khi xử lý và lọc loại bỏ trình tự xấu, kết quả FastQC cho thấy dữ liệu giải trình tự từ 4 mẫu vi khuẩn nhìn chung có chất lượng tương đối tốt (Bảng 3.1). Nhìn chung, số lượng trình tự đạt từ 12 - 17 triệu đoạn đọc có độ dài 150 bp, với tổng kích thước dữ liệu đạt từ 1.8 - 2.5 Gb. Hàm lượng GC cao, trong khoảng 66-67%, phù hợp với các công bố về trình tự vi khuẩn BCC trước đó. Tương tự, dữ liệu giải trình tự đoạn dài thu được ở mỗi chủng đạt từ 393 - 699 Mb (Bảng 3.2). dữ liệu trình tự đoạn ngắn và đoạn dài sau tinh sạch được

lắp ráp tạo bộ gene lai cho từng chủng vi khuẩn. Cả trình tự đoạn ngắn và đoạn dài thu được đều có độ bao phủ rất tốt, 300x và 50x, tương ứng.

Bảng 3.1. Kết quả so sánh FastQC kiểm tra chất lượng giải trình tự đoạn ngắn đọc cặp (paired-end), trước (Raw) và sau khi sử dụng (Trimmed) Trimmomatic trên 4 chủng *Burkholderia* spp. được phân lập.

	ID	Paired end	Total Sequence (reads)	Total Bases (Gbp)	Sequence length	%GC
RAW	862	Reverse	16733441	2.5	150	66
		Forward	16733441	2.5	150	66
	899	Reverse	13951537	2	150	67
		Forward	13951537	2	150	67
	1065	Reverse	12848485	1.9	150	67
		Forward	12848485	1.9	150	66
	2027	Reverse	17285204	2.5	150	67
		Forward	17285204	2.5	150	67
TRIMMED	862	Reverse	16679810	2.4	2-150	66
		Forward	16679810	2.4	2-150	66
	899	Reverse	13906711	2	2-150	67
		Forward	13906711	2	2-150	67
	1065	Reverse	12806326	1.8	2-150	66
		Forward	12806326	1.8	2-150	66
	2027	Reverse	17234443	2.5	2-150	67
		Forward	17234443	2.5	2-150	67

Bảng 3.2: Kết quả QC dữ liệu trình tự đoạn dài Nanopore các chủng *Burkholderia* spp.

Chủng <i>Burkholderia</i> spp.	Dữ liệu trình tự Nanopore
862	405 Mb
899	699 Mb
1065	649 Mb
2027	393 Mb

3.2.2. Lắp ráp de novo và tạo bộ gene lai hoàn chỉnh cho các chủng *Burkholderia* spp.

Để xác định hiệu quả lắp ráp bộ gene lai cho 4 chủng vi khuẩn *Burkholderia* spp., chúng tôi sử dụng hai công cụ là SPAdes và Unicycler. Kết quả phân tích trình tự các chủng 862, 899, 1065 và 2027 sau lắp ráp cho thấy SPAdes có số lượng contigs tương ứng là 140, 722, 82, 2255 cao hơn nhiều so với Unicycler (4, 3, 3, 3 contigs) (Bảng 3.3). Như vậy, Unicycler tạo ra các contigs dài và ít bị phân mảnh hơn, nên có giá trị N50 trung bình cao hơn đáng kể so với lắp ráp bằng SPAdes (giá trị N50 trung bình, lần lượt là $3,24 \times 10^6$ so với $2,8 \times 10^5$ kb. $P < 0,05$). Giá trị L50 cũng thể hiện trình tự được lắp ráp sử dụng Unicycler có kết quả tốt hơn so với SPAdes (giá trị L50 trung bình tương ứng là 2 so với 11,25; $P < 0,05$). Do đó, dữ liệu trình tự lắp ráp bằng Unicycler được sử dụng cho các phân tích tiếp theo.

Bảng 3.3. So sánh số lượng contigs và N50, L50 giữa trình tự SPAdes và Unicycler.

ID No.	Số lượng Contigs		N50		L50	
	SPAdes	Unicycler	SPAdes	Unicycler	SPAdes	Unicycler
862	140	4	156859	3108039	17	2
899	722	3	331932	3506399	10	2
1065	82	3	344774	3245138	9	2
2027	2255	3	296935	3091011	9	2

Trình tự bộ gene lai lắp ráp de novo của 4 chủng *Burkholderia* spp. có chiều dài trong khoảng từ 7,6 Mb đến 8,066 Mb, hàm lượng GC > 67%. Các giá trị độ sâu/độ bao phủ nằm trong khoảng từ 0,94 đến 1,06, độ hoàn thiện > 99,6% khi so với trình tự chủng tham chiếu *Burkholderia cenocepacia* J2315 (mã số Genbank: NC_011001.1). Tất cả các contigs lắp ráp được của mỗi chủng đều đóng vòng cho thấy bộ gene lai của các chủng này đã hoàn chỉnh (Bảng 3.4). Đây là kết quả rất quan trọng, cho phép phân tích được đầy đủ các đặc điểm di truyền liên quan đến kháng thuốc và khả năng gây bệnh ở những chủng này. Đây là một lợi thế rất lớn so với việc chỉ sử dụng trình tự đoạn ngắn hoặc đoạn dài riêng lẻ mà không thu được trình tự bộ gene hoàn chỉnh. Cụ thể, bộ gene chủng *B. cenocepacia* 862 gồm 3 nhiễm sắc thể (chromosome) và 1 plasmid với tổng kích thước là 8142708 bp; chủng *B. cenocepacia* 899 gồm 3 chromosome với tổng kích thước là 7842844 bp; *B. cenocepacia* 1065 gồm 3 chromosome với tổng kích thước là 7842844 bp; và chủng *B. cenocepacia* 2027 gồm 3 chromosome là 7732917 bp (Bảng 3.4).

Bảng 3.4. Đặc điểm bộ gene các chủng *Burkholderia* spp

ID No.	Số lượng contigs	Đồng vòng (True/False)	Độ sâu (x)	Chiều dài (kb)	Kết quả Blastn	Hàm lượng GC (%)	Độ hoàn thiện (%)
862	1	True	1,03	3754673	Chromosome 1	67	99,7
	2	True	1	3108039	Chromosome 2		
	3	True	0,96	1115092	Chromosome 3		
	4	True	1,4	164904	Plasmid		
899	1	True	1,06	3506399	Chromosome 1	67,26	99,7
	2	True	1	3245138	Chromosome 2		
	3	True	0,94	1091307	Chromosome 3		
1065	1	True	1,04	3506399	Chromosome 1	67,26	99,7
	2	True	1	3245138	Chromosome 2		
	3	True	0,95	1091307	Chromosome 3		
2027	1	True	1,07	3664032	Chromosome 1	67,33	99,6
	2	True	1	3091011	Chromosome 2		
	3	True	0,95	977874	Chromosome 3		

Như vậy, trong 4 chủng *Burkholderia* spp. được nghiên cứu, chỉ duy nhất chủng 862 có chứa plasmid. Đây là một đặc điểm quan trọng, cho thấy khả năng tiếp nhận gene từ bên ngoài thông qua cơ chế chuyển gene ngang. Bên cạnh đó, hầu hết các plasmids thường mang gene kháng thuốc và hoặc gene gây bệnh, cũng như các trình tự gene di truyền di động cho phép chúng gắn kết - chuyển gene kháng, gene độc lên chromosome của vi khuẩn chủ.

3.3. Định danh vi khuẩn bằng trình tự 16S rRNA và xây dựng cây phát sinh loài bằng trình tự core genome (các gene lõi)

Trình tự đầy đủ gene 16S rRNA của các chủng *Burkholderia* spp. được tách ra từ trình tự bộ gene lai bằng công cụ Barnap và sử dụng công cụ Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để so sánh, phân loại vi khuẩn. Kết quả phân tích cho thấy, cả 4 chủng *Burkholderia* spp. đều thuộc loài *B. cenocepacia* (100%). Như vậy, so với kết quả định danh nhanh ban đầu bằng MALDI-TOF, chỉ duy nhất chủng 1065 được định danh chính xác bằng cả hai phương pháp, trong khi 3 chủng còn lại thì MALDI-TOF chỉ cho ra tên loài là *B. cepacia* (Bảng 3.5). Các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng, do các loài thuộc chi *Burkholderia* có đặc điểm di truyền rất gần nhau nên phương pháp định danh

nhau bằng MALDI-TOF, cũng như các xét nghiệm sinh hoá hoặc giải trình tự một phần gene 16S rRNA sẽ cho những kết quả khác nhau. Do đó giải trình tự toàn bộ gene 16S rRNA hoặc phát triển các công cụ chẩn đoán phân tử cho vùng gene đích đặc trưng của mỗi loài *Burkholderia* sẽ cho phép định danh chính xác hơn. Như vậy, giải trình tự toàn bộ gene không chỉ cho phép định danh chính xác tuyệt đối loài vi khuẩn mà còn cung cấp đầy đủ dữ liệu gene làm cơ sở để phát triển các công cụ chẩn đoán phân tử nhanh, điều này có ý nghĩa rất lớn trong lâm sàng vì góp phần xác định phác đồ điều trị chính xác, kịp thời, đem lại hiệu quả điều trị cao.

Bảng 3.5. Kết quả định danh bằng vi khuẩn *Burkholderia* spp. bằng MALDI-TOF và so sánh trình tự gene 16s rRNA

Malditof			16S RNA	
ID	Organsism	Điểm	Organism	Phần trăm tương đồng
862	Burkholderia Cepacia Group	1,89	Burkholderia Cenocepacia	100
899	Burkholderia Cepacia Group	1,96	Burkholderia Cenocepacia	100
1065	Burkholderia Cenocepacia	1,98	Burkholderia Cenocepacia	100
2027	No Organism Identification Possible	1,66	Burkholderia Cenocepacia	100
			Burkholderia Cenocepacia J2315	100

Cây phát sinh loại dựa trên trình tự core genome từ các chủng thuộc BCC lại cho thấy 4 chủng *B. cenocepacia* nằm ở 1 cụm hoàn toàn tách biệt với các chủng trên thế giới, cho thấy 4 chủng này có mức độ gần gũi di truyền rất cao (Hình 3.2). Đặc biệt là 2 chủng 899 và 1065 gần như có mối liên quan về di truyền - dịch tễ. Trong khi đó các chủng đại diện thế giới phân nhánh đơn, tạo các cụm riêng lẻ, thể hiện sự đa dạng di truyền cao. Trong thực tế, việc định danh phân nhóm BCC chính xác là rất quan trọng, vì một số loài có khả năng gây bệnh với độc lực cao hơn các loài còn lại như *B. cenocepacia*, *B. multivorans* và *B. dolosa* trong đó *B. cenocepacia* thường được coi là loài độc nhất. Ngược lại, một số loài khác lại ít độc và gây bệnh với tỷ lệ thấp hơn như *B. vietnamiensis*. Đặc biệt, trong nhóm vi khuẩn BCC, hai loài *B. cenocepacia* và *B. multivorans* chiếm tỷ lệ cao nhất, chiếm đến 85–97% các ca nhiễm trùng lâm sàng [31]. Trong đó, *B.*

cenoecepacia được xem là một tác nhân gây bệnh cơ hội quan trọng, đặc biệt ở các đối tượng suy giảm miễn dịch, bệnh nhân xơ nang và bệnh u hạt mạn tính [32]. Ở bệnh nhân xơ nang, loài này có thể gây ra hội chứng cepacia – một tình trạng bệnh lý nghiêm trọng và có thể gây tử vong, đặc trưng bởi sự suy giảm nhanh chóng chức năng hô hấp, viêm phổi hoại tử, tiến triển đến nhiễm khuẩn huyết và sốc nhiễm trùng, làm gia tăng tỷ lệ tử vong [33].

B. cenoecepacia phân bố phổ biến trong cả môi trường tự nhiên và nhân tạo nhờ vào khả năng thích nghi cao, bao gồm tốc độ đột biến nhanh và sự đa dạng về chuyển hóa [34]. Tính đa dạng sinh thái, di truyền và chuyển hóa đáng kể của loài này được cho là bắt nguồn từ bộ gene có kích thước lớn bất thường (7–9 Mbp), bao gồm nhiều nhiễm sắc thể, cùng với khả năng chuyển hoá đa dạng các hợp chất từ đơn giản đến phức tạp. Ngoài ra, khả năng thường xuyên thu nhận các yếu tố di truyền di động thông qua cơ chế chuyển gene ngang đã đóng góp quan trọng vào sự tiến hoá kháng thuốc và độc lực của chúng [35, 36].



Hình 3.2. Cây phát sinh chủng loài của 4 chủng *B. cenoecepacia* trong nghiên cứu này (màu đỏ) so với các chủng BCC trên thế giới dựa trên core genome. Độ tin cậy phân nhánh các chủng trên cây phả hệ được thể hiện thông qua màu sắc bootstrap. Các giá trị bootstrap màu xanh dương (1,0) phản ánh mức độ tin cậy cao, và giảm dần đối với các màu tương ứng.

3.4. Định tuyp phân tử, kiểu gene các chủng *B. cenocepacia*

Phân tích trình tự 7 loci (*atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, *phaC*, *trpB*) của bốn chủng vi khuẩn *B. cenocepacia* cho thấy hai chủng 899 và 1065 cùng mang kiểu gene (Sequence Type - ST) ST1697 (Bảng 3.6). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với phân tích cây phả hệ ở trên. Bên cạnh đó, chủng 2027 có kiểu gene là ST2262, trong khi chủng 862 không thể xác định được kiểu gene trên cơ sở dữ liệu cho thấy chủng này có kiểu gene hoàn toàn mới (chưa được công bố trước đó). Điều này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc tiếp tục nghiên cứu và mở rộng cơ sở dữ liệu MLST để hiểu rõ hơn về sự đa dạng di truyền của BCC. Phân tích MLST không chỉ cung cấp cái nhìn về sự đa dạng di truyền của BCC mà còn làm sáng tỏ các mối liên hệ dịch tễ học tiềm ẩn giữa các chủng vi khuẩn. Thông tin này rất quan trọng trong việc đánh giá nguy cơ, theo dõi sự lây lan và phát triển các chiến lược kiểm soát nhiễm khuẩn hiệu quả đối với BCC. Thật vậy, cho đến nay, kiểu trình tự ST1697 mới chỉ được phát hiện ở Bỉ và ST2262 lại được công bố duy nhất ở Đài Loan (Bảng 3.7).

Bảng 3.6. Kiểu trình tự MLST và thông tin kiểu gene của 4 chủng *B. cenocepacia*

Mẫu	Loài	ST	<i>atpD</i>	<i>gltB</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>	<i>lepA</i>	<i>phaC</i>	<i>trpB</i>	Phân bố
862	BCC	-	15	11	537	317	11	6	79	-
899	BCC	1697	15	11	206	14	11	141	147	Bỉ
1065	BCC	1697	15	11	206	14	11	141	147	Bỉ
2027	BCC	2262	15	11	206	14	152	122	147	Đài Loan

Trong số hàng nghìn trình tự bộ gene *Burkholderia* spp. đã được công bố trên cơ sở dữ liệu quốc tế, chỉ có 04 chủng từ Việt Nam (Bảng 3.9) gồm 02 chủng *B. vietnamiensis*, 01 chủng *B. cepacia* và 01 chủng *B. dolosa*, mà chưa có dữ liệu bộ gene của *B. cenocepacia*. Điều này cho thấy còn quá ít dữ liệu bộ gene các chủng *Burkholderia* spp. của Việt Nam được nghiên cứu và công bố, trái ngược hẳn với tình hình dịch tễ học phức tạp và sự gây bệnh phổ biến của *Burkholderia* spp. ở Việt Nam. Do đó kết quả của nghiên cứu này lần đầu tiên báo cáo lấp ráp thành công bộ gene hoàn chỉnh của 04 chủng *B. cenocepacia* của Việt Nam. Đây

sẽ là dữ liệu quan trọng để tham chiếu cho các nghiên cứu trong và ngoài nước trong thời gian tới.

Bảng 3.7. Dữ liệu MLST và kiểu gene của các chủng *Burkholderia* spp. phân lập ở Việt Nam (nguồn: <https://pubmlst.org/>)

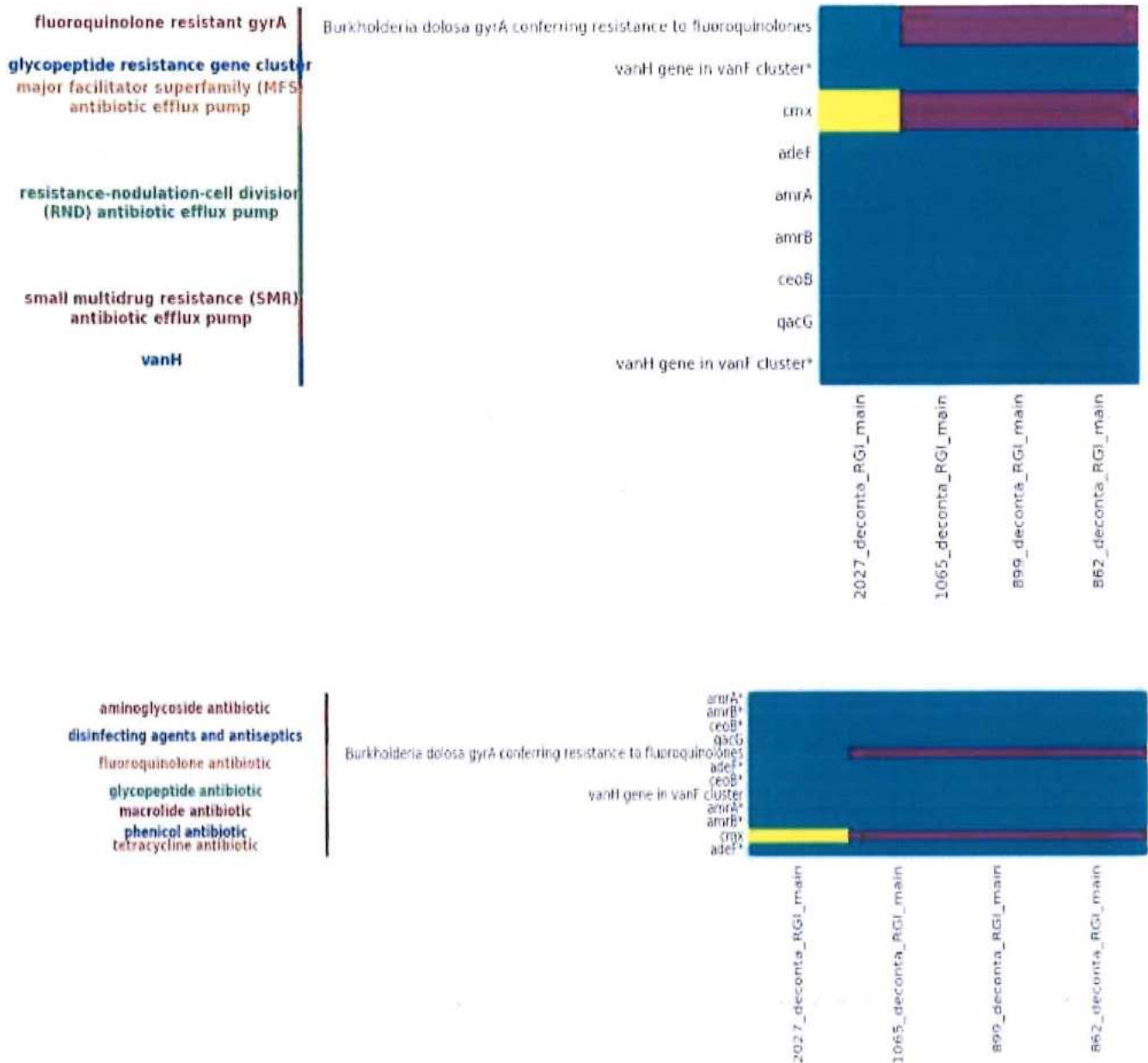
Isolate fields								MLST								
Id	isolate	aliases	species	genomovar	country	source	year	atpD	qltB	gyrB	recA	lepA	phaC	trpB	ST	clonal complex
1895	BCC0030	FC0369	Burkholderia vietnamiensis		Vietnam	environmental	1990	27	19	15	23	35	11	17	379	319
2680	PT02		Burkholderia cepacia	I	Vietnam	non-CF patient	2018	2	612	912	37	427	93	48	1400	
4960	N149		Burkholderia dolosa	VI	Vietnam	non-CF patient	2021	728	968	1426	24	463	646	20	2237	
5017	LMG 10929		Burkholderia vietnamiensis		Vietnam	environmental		27	19	15	23	35	11	17	379	319

3.5. Đặc điểm di truyền kháng kháng sinh và gây bệnh của các chủng *B. cenocepacia*

3.5.1. Kiểu gene kháng kháng sinh

Phân tích trình tự bộ gene các chủng xác định được các tổ hợp gene mã hoá hệ bơm thải đa thuốc như RND, SMR và MFS (Hình 3.3). Tuy nhiên khả năng kháng thuốc sẽ phụ thuộc vào mức độ biểu hiện và hoạt động của các gene này đối với từng loại thuốc. Bên cạnh đó các gene và đột biến gene liên quan đến kháng quinolones, glycopeptides, tetracycline, macrolide và chloramphenicol cũng đã được phát hiện. Kết quả này cũng phù hợp với kiểu hình kháng thuốc của các chủng này. Cụ thể, đối với nhóm aminoglycoside, tất cả các chủng đều kháng gentamicin và tobramycin. Tương đồng về mặt kiểu gene khi các chủng đều mang gene *amrA* và *amrB*, mã hóa cho bơm đẩy AmrAB-OprA, một hệ thống bơm đẩy đa kháng thuốc (MDR) ở BCC, có khả năng đẩy aminoglycoside ra khỏi tế bào. Đối với nhóm penicillins + beta-lactam, các chủng đều kháng amoxicillin/clavulanic acid và ticarcillin. Mặc dù không phát hiện được gene kháng beta-lactam cụ thể ở cả 4 chủng *B. cenocepacia*, tuy nhiên các bơm thải đa kháng thuốc được phát hiện có thể chịu trách nhiệm cho tính kháng này. Chủng 2027 kháng trimethoprim/sulfamethoxazole có thể liên quan đến sự hiện diện của gene *cmx* mã hóa cho bơm đẩy, trong khi đó lại không xác định được gene nào liên quan đến kháng trimethoprim/sulfamethoxazole ở chủng 862. Ngoài ra, chủng 862 kháng trung gian với meropenem, cơ chế kháng ở chủng này cần được điều tra thêm, có thể liên quan đến đột biến trên protein đích hoặc các bơm đẩy khác. Sự khác biệt về độ nhạy cảm với một số thuốc kháng sinh có thể liên quan

đến mức độ biểu hiện của bơm đẩy hoặc các cơ chế kháng thuốc khác chưa được kiểm chứng trước đó.



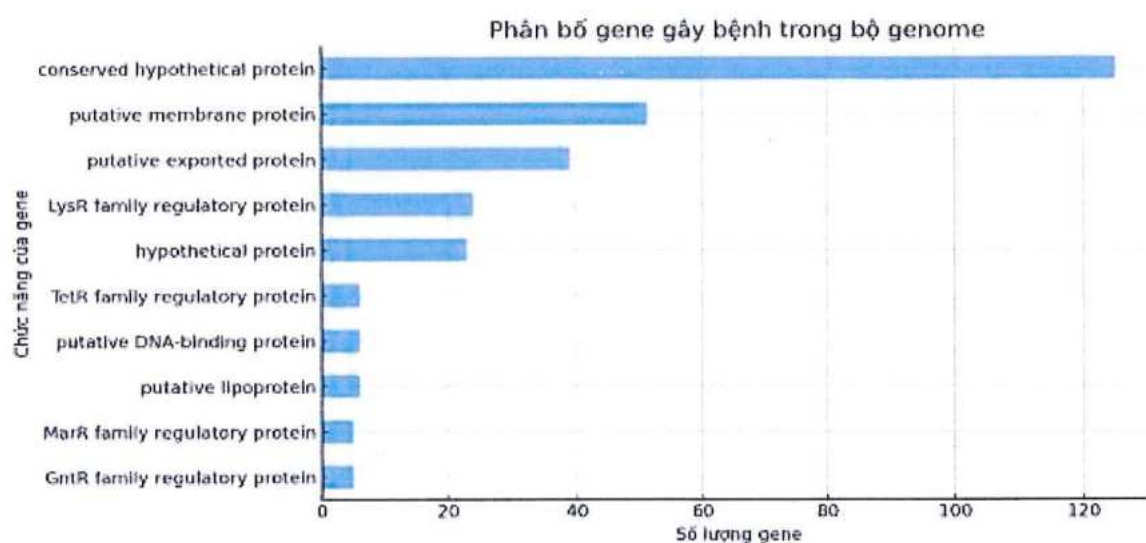
Hình 3.3. Biểu đồ nhiệt thể hiện các gene kháng kháng sinh theo nhóm thuốc được tìm thấy ở các chủng *B. cenocepacia*. Màu sắc đại diện cho kết quả so khớp trình tự gene kháng trên cơ sở dữ liệu CARD. Màu tím biểu thị mức độ tương đồng rất thấp, trong khi màu xanh lá cây biểu thị mức độ tương đồng cao và màu vàng biểu thị mức độ tương đồng rất cao.

Các nghiên cứu cho thấy, vi khuẩn BCC kháng thuốc thường liên quan đến tỷ lệ tử vong của bệnh nhân rất cao. Nhiều cơ chế kháng thuốc ở BCC đã được mô tả gồm sản xuất các enzym biến đổi hoặc phân hủy, thay đổi đích phân tử của kháng sinh, tăng tính thấm của tế bào và đặc biệt là tăng sự đào thải thuốc. Ngoài ra, vi khuẩn BCC thường tạo màng sinh học (biofilm) làm tăng khả năng bắt dính nạp thuốc của chúng [37]. Hiện nay, mức độ kháng thuốc đang tăng cao đối với hầu hết các loại kháng sinh (β -lactam, polymyxin và aminoglycoside) thường được dùng trong điều trị nhiễm BCC, nên việc điều trị *B. cenocepacia* trong thực tiễn lâm sàng ngày càng khó khăn, đòi hỏi phải kết hợp ít nhất ba loại kháng sinh. Trong số các cơ chế kháng kháng sinh đáng quan tâm nhất là hệ thống các bơm đẩy (thải) đa thuốc như hệ bơm RND tham gia vào quá trình thải ra chủ động nhiều phân tử khác nhau về mặt hóa học có nguy hại cho tế bào và do đó, tham gia vào kiểu hình kháng nhiều loại thuốc [38]. Các nghiên cứu chỉ ra rằng không dưới 15 loại bơm RND đã được tìm thấy ở *B. cenocepacia* J2315 và vai trò của chúng trong quá trình kháng kháng sinh đã được chứng minh đối với ít nhất 5 trong số đó [39]. Một số gene kháng thuốc quan trọng khác cũng thường được tìm thấy ở BCC bao gồm: *bla* là gene mã hóa cho các beta-lactamase, enzym phá hủy các kháng sinh beta-lactam như penicillin và cephalosporin. Gene *catA* mã hóa cho chloramphenicol acetyltransferase, enzym bất hoạt chloramphenicol. Gene *tet* mã hóa cho các protein kháng tetracycline, ngăn chặn tác động của tetracycline lên vi khuẩn và gene *aac* mã hóa cho các aminoglycoside acetyltransferase, enzym bất hoạt các aminoglycoside. Kháng β -lactam thường được điều hòa bởi bơm đẩy hoặc sản xuất β -lactamase lớp A, mã hóa bởi gene *penA*. Sự đa dạng và phức tạp của các kiểu gene kháng kháng sinh ở BCC là một thách thức lớn đối với việc điều trị nhiễm trùng do BCC. Hiểu rõ về các cơ chế kháng thuốc này là rất quan trọng để phát triển các chiến lược mới nhằm vượt qua sự kháng thuốc và tìm ra các liệu pháp điều trị hiệu quả hơn.

3.5.2. Đặc điểm di truyền liên quan đến khả năng gây bệnh của *B. cenocepacia*

Phân tích trình tự bộ gene các chủng *B. cenocepacia* xác định được 10 nhóm gene chính liên quan đến khả năng lây nhiễm gây bệnh, trong đó nhóm gene mã hóa protein chức năng chưa được nghiên cứu đầy đủ chiếm số lượng lớn nhất ($n = 125$) (Hình 3.4). Kết quả này cho thấy bộ genome của vi khuẩn chứa nhiều gene

tiềm năng có thể liên quan đến độc lực, sinh tồn hoặc thích nghi với môi trường, đòi hỏi nghiên cứu sâu hơn để xác định vai trò cụ thể của chúng. Tiếp theo là nhóm gene mã hoá protein màng trong vận chuyển chất, cảm biến tín hiệu và khả năng tương tác với vật chủ hoặc môi trường ngoại bào (putative membrane protein), và nhóm các protein tiết trong cơ chế gây bệnh, bao gồm việc bài tiết độc tố hoặc điều hòa miễn dịch của vật chủ (putative exported protein), lần lượt chiếm 50 và 40 gene. Các protein điều hòa đóng vai trò quan trọng trong kiểm soát biểu hiện gene, với LysR family regulatory protein (25 gene), TetR family regulatory protein (10 gene), MarR và GntR family regulatory protein (5 - 10 gene mỗi loại). Những protein này thường tham gia vào điều hòa kháng sinh, đáp ứng stress và chuyển hóa, có thể ảnh hưởng đến khả năng sinh tồn cũng như đề kháng của vi khuẩn. Ngoài ra, nhóm putative DNA-binding protein (10 gene) và putative lipoprotein (5 gene) cũng có xuất hiện, thể hiện có sự tham gia của các yếu tố liên quan đến điều hòa phiên mã và cấu trúc màng tế bào.



Hình 3.4. Phân bố gene độc lực theo nhóm trong bộ genome của các chủng *B. cenocepacia*.

Việc xác định số lượng lớn các gene mã hoá proteins chưa rõ chức năng trong bộ gene của các chủng *B. cenocepacia* cho thấy tiếp tục nghiên cứu giải mã xác định chức năng của các gene này là việc hết sức cần thiết để hiểu rõ hơn về cơ chế phân tử liên quan đến khả năng gây bệnh, lây nhiễm và thích ứng môi trường, thích ứng vật chủ của chúng. Bên cạnh đó, sự hiện diện đáng kể của

protein màng và protein xuất tiết cho thấy vi khuẩn có thể sử dụng nhiều cơ chế để tương tác với môi trường hoặc vật chủ, như hấp thụ chất dinh dưỡng, bài tiết độc tố hoặc chống lại hệ miễn dịch. Những gene và/hoặc protein này có thể được nghiên cứu khai thác để phát triển các công cụ chẩn đoán nhanh, chính xác cũng như có thể là đích phân tử cho việc nghiên cứu phát triển kháng sinh, vaccine trong phòng ngừa và điều trị nhiễm khuẩn *B. cenocepacia*. Mặc dù các protein điều hòa như LysR, TetR, MarR và GntR chiếm số lượng gene ít hơn, nhưng chúng lại có ảnh hưởng mạnh đến các quá trình điều hòa gene, từ đó kiểm soát khả năng kháng thuốc, phản ứng với stress và thích nghi với môi trường khắc nghiệt. Kết quả biểu thị gene độc lực này kết hợp với gene kháng kháng sinh, cung cấp cái nhìn trực quan về thành phần gene trong bộ genome mà còn mở ra nhiều hướng nghiên cứu tiềm năng. Qua đó, có thể khai thác các gene chưa biết chức năng và hiểu rõ hơn các yếu tố điều hòa cho đến khám phá cơ chế hoạt động của protein tham gia. Những nghiên cứu tiếp theo sẽ có ý nghĩa quan trọng trong lĩnh vực vi sinh, y sinh và phát triển thuốc kháng sinh hoặc phương pháp kiểm soát vi khuẩn hiệu quả hơn.

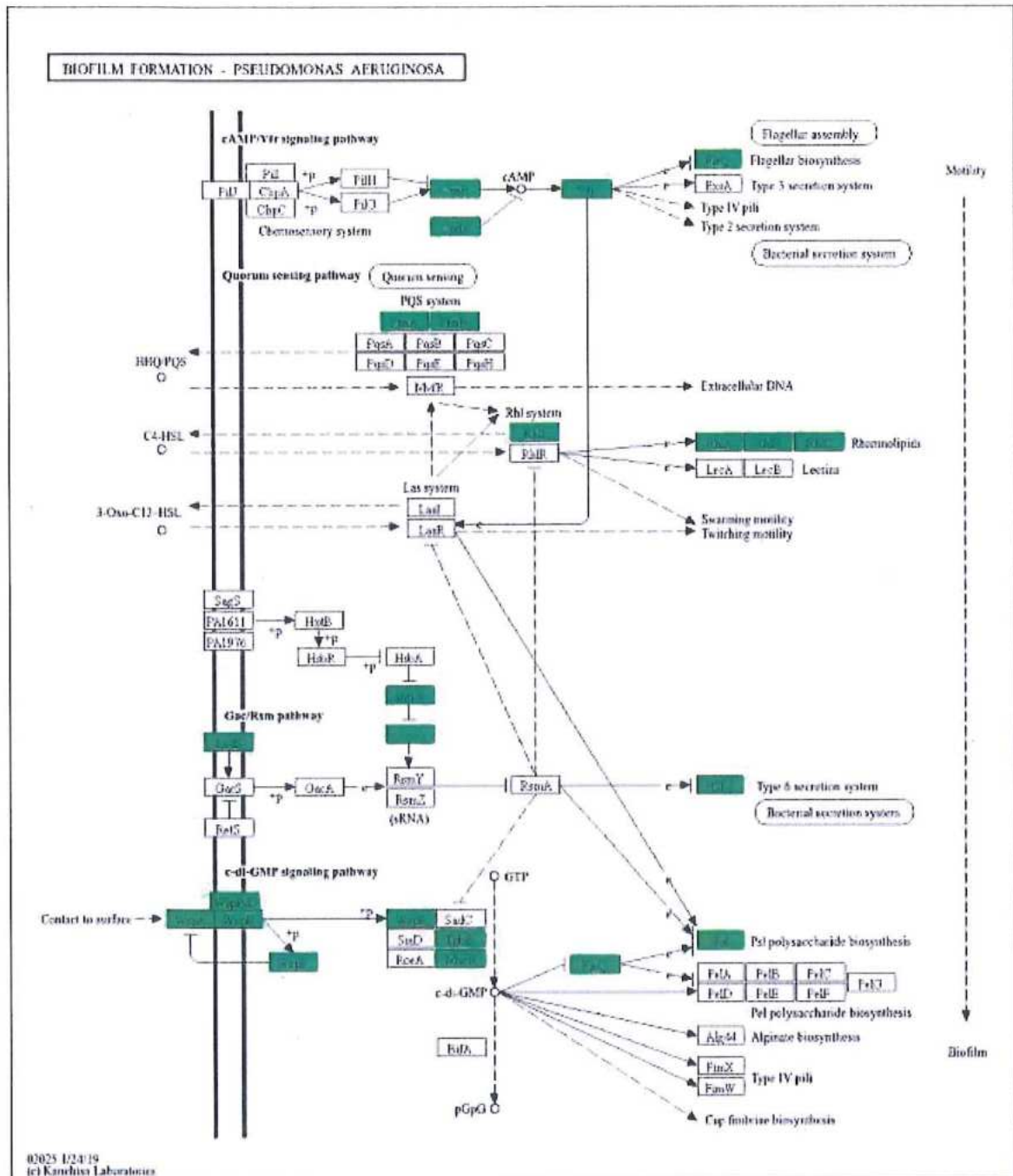
3.6. Cơ chế chuyển hoá của vi khuẩn

Một trong những con đường chuyển hóa cơ bản góp phần vào độc lực và độc tính của BCC là chuyển hóa cysteine và methionine, đóng vai trò quan trọng trong cân bằng oxy hóa khử, cảm biến số lượng, hình thành màng sinh học và kháng kháng sinh. Kết quả phân tích KEGG cho thấy hai con đường chuyển hóa chung giữa bốn chủng *B. cenocepacia* gồm hình thành màng sinh học (biofilm) và chuyển hóa cysteine/methionine. Số lượng KO (KEGG Orthology) liên quan đến các con đường này gần như giống nhau giữa các chủng, như thể hiện trong Bảng 3.8. Cả bốn chủng đều mang số lượng gene tham gia vào con đường chuyển hoá là 31, liên quan đến sự hình thành màng sinh học, trong khi các chủng 862, 899 và 1065 có chung số lượng KO là 35 đối với quá trình chuyển hóa cysteine và methionine, với chủng 2027 cho thấy số lượng thấp hơn không đáng kể gồm 34 gene.

Bảng 3.8. Số lượng KO liên quan đến các cơ chế trao đổi chất trên bốn chủng *B. cenocepacia*

Con đường chuyển hoá	Số lượng KO ở các chủng <i>B. cenocepacia</i>			
	862	899	1065	2027
Biofilm	31	31	31	31
Cysteine và methionine	35	35	35	34

Quan sát này về các cấu hình KO gần như giống hệt nhau đối với quá trình hình thành màng sinh học giữa các chủng cho thấy tiềm năng di truyền được bảo tồn đối với đặc điểm độc lực quan trọng này trong các thành viên BCC này. Sự hình thành màng sinh học là một quá trình phức tạp ở vi khuẩn, bao gồm một loạt các con đường truyền tín hiệu và điều hòa gene, như được minh họa bằng sơ đồ con đường hình thành màng sinh học tương tự như ở vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* (Hình 3.5). Đây là yếu tố quan trọng trong sự tồn tại của BCC trong nhiều môi trường khác nhau, bao gồm phổi của bệnh nhân xơ nang và khả năng kháng thuốc kháng khuẩn của nó [40]. Mức độ bảo tồn cao trong số lượng KO đối với các gene liên quan đến màng sinh học chỉ ra sự tương đồng cơ bản trong cơ chế phân tử cốt lõi thúc đẩy quá trình này ở các chủng này. Tuy nhiên, điều quan trọng cần lưu ý là mặc dù tiềm năng có thể tương tự nhau, nhưng khả năng hình thành màng sinh học thực tế và đặc điểm vẫn có thể khác nhau do sự thay đổi trong biểu hiện gene, cơ chế điều hòa hoặc các yếu tố môi trường ở từng vi khuẩn [41].



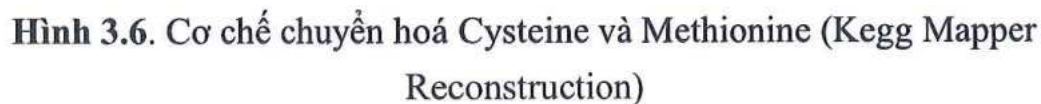
Hình 3.5. Cơ chế tạo màng sinh học ở vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* (Kegg Mapper Reconstruction)

Sự thay đổi nhỏ được quan sát thấy ở quá trình chuyển hóa cysteine và methionine, với chủng 2027 có số KO ít hơn các chủng khác, là điều đáng chú ý. Cysteine và methionine là những axit amin chứa lưu huỳnh thiết yếu tham gia vào nhiều quá trình của tế bào, bao gồm tổng hợp protein, cân bằng oxy hóa khử và tổng hợp sinh học các chất chuyển hóa quan trọng như glutathione và S-

adenosylmethionine (SAME), như được mô tả trong bản đồ con đường chuyển hóa cysteine và methionine (Hình 3.6). Các con đường này có mối liên hệ chặt chẽ với nhau, như thể hiện trong sơ đồ, và đóng vai trò quan trọng trong quá trình thích nghi và tồn tại của vi khuẩn. Mặc dù sự khác biệt là nhỏ, nhưng nó có khả năng chỉ ra những biến thể tinh tế trong hiệu quả trao đổi chất hoặc khả năng kiểm soát quy định của các con đường này ở chủng 2027. Ví dụ, nó có thể ảnh hưởng đến khả năng phản ứng với stress oxy hóa, tổng hợp các hợp chất chứa lưu huỳnh hoặc tương tác với môi trường của chủng [40, 41].

Chuyển hóa cysteine đóng vai trò trung tâm trong quá trình đồng hóa lưu huỳnh, sản xuất glutathione và cơ chế giải độc trong BCC. Tuy nhiên, cysteine dư thừa có thể dẫn đến các tác động độc hại thông qua sự tích tụ của các loài lưu huỳnh phản ứng (RSS) và các loài oxy phản ứng (ROS), ảnh hưởng đến cả sự sống còn của vi khuẩn và phản ứng miễn dịch của vật chủ. Sản xuất sulfide và các loài lưu huỳnh phản ứng (RSS), sự phân hủy cysteine dẫn đến sự tạo ra hydro sunfua (H_2S), 3-mercaptopyruvate và thiosulfate, đóng vai trò kép là tác nhân bảo vệ chống lại oxy hóa và là độc tố phá vỡ chức năng tế bào của vật chủ. Các enzyme chính tham gia bao gồm: Cysteine desulfurases (EC 2.8.1.7) – Chuyển đổi cysteine thành các chất trung gian lưu huỳnh, góp phần gây độc tính; 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (EC 2.8.1.2) – Tạo ra các hợp chất lưu huỳnh sulfane độc hại. Tác động độc tính: H_2S can thiệp vào quá trình hô hấp ty thể trong tế bào vật chủ, dẫn đến chết tế bào, trong khi các hợp chất lưu huỳnh sulfane có thể biến đổi protein vật chủ, phá vỡ các con đường truyền tín hiệu miễn dịch.

Con đường tổng hợp glutathione (GSH) rất quan trọng để bảo vệ BCC chống lại stress oxy hóa, đặc biệt là từ phản ứng miễn dịch của vật chủ và kháng sinh. Một số enzyme chính như: Glutathione synthase (EC 6.3.2.3) – Xúc tác quá trình sinh tổng hợp GSH từ cysteine, glycine và glutamate; Glutathione reductase (EC 1.8.1.7) – Duy trì GSH ở dạng khử, trung hòa stress oxy hóa. Con đường này có thể tác động đến nhiễm trùng bằng cách trung hòa kháng sinh: GSH phản ứng với các loài oxy phản ứng do kháng sinh như aminoglycoside tạo ra, làm giảm hiệu quả của chúng. Hơn nữa, điều này hỗ trợ sự hình thành màng sinh học với GSH giúp duy trì cân bằng oxy hóa khử trong màng sinh học, tăng cường sự tồn tại của vi khuẩn trong nhiễm trùng phổi CF [44].



Hình 3.6. Cơ chế chuyển hoá Cysteine và Methionine (Kegg Mapper Reconstruction)

3.7. Các yếu tố di truyền di động của vi khuẩn *B. cenocepacia*

Sự hiện diện của prophage trong bộ gene vi khuẩn, là một trong những chỉ dấu quan trọng góp phần vào khả năng tiến hóa kháng thuốc và độc lực của vi khuẩn. Kết quả phân tích trình tự bộ gene các chủng *B. cenocepacia* cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các chủng, không chỉ về số lượng prophage mà còn về vị trí tích hợp trên genome và chức năng tiềm năng của chúng (Bảng 3.9 và Hình 3.5). Mỗi chủng *B. cenocepacia* mang từ 2 đến 5 prophage, với mức độ hoàn chỉnh khác nhau, bao gồm prophage hoàn chỉnh (intact), nghi vấn (questionable) và không hoàn chỉnh (incomplete). Trong số này, chủng 862 và 2027 có số lượng prophage cao nhất (5 prophage mỗi chủng), trong khi 899 và 1065 chỉ chứa 2 prophage, cho thấy sự khác biệt trong mức độ tiếp nhận hoặc bảo tồn các yếu tố di truyền di động giữa các dòng vi khuẩn. Không chỉ khác biệt về số lượng, các prophage còn có sự phân bố không đồng đều trên genome của từng chủng. Kết quả phân tích cho thấy Chromosome 1 và Chromosome 2 là những vị trí phổ biến nhất cho sự tích hợp của prophage, với nhiều prophage có kích thước lớn được xác định tại đây. Chủng 2027 chứa prophage có kích thước lớn nhất (60,1 kb) nằm trên chromosome 3, mang nhiều gene liên quan đến integrase, recombinase và transposase. Điều này thể hiện rằng prophage này có thể đóng vai trò quan trọng trong quá trình tái tổ hợp di truyền của vi khuẩn. Chủng 862 cũng có một prophage kích thước lớn (58,7 kb) trên chromosome 2, mang nhiều gene mã hóa các protein cấu trúc quan trọng của phage như capsid, terminase và portal, cho thấy khả năng prophage này có thể từng tham gia vào chu kỳ tan rã (lytic) trước khi bị bất hoạt. Trái ngược với hai chủng trên, 899 và 1065 có prophage nhỏ hơn (23-47 kb) và nằm chủ yếu trên chromosome 1 và chromosome 2 với ít dấu hiệu của các gene liên quan đến tái tổ hợp.

Các prophage được xác định trong nghiên cứu này mang nhiều gene mã hóa protein liên quan đến chức năng của bacteriophage, bao gồm integrase, transposase, protein đuôi (tail proteins), capsid, terminase và lysin. Những gene này có thể tham gia vào quá trình tái tổ hợp, duy trì prophage trong hệ gene vi khuẩn hoặc điều chỉnh cơ chế hoạt động của prophage [44]. Trong số các prophage được phát hiện, chủng 862 chứa prophage có bộ gene đa dạng nhất, với sự hiện diện của các protein quan trọng như lysin, tail, capsid và protease, cho thấy khả năng prophage này từng tham gia vào quá trình ly giải tế bào chủ. Trong khi đó,

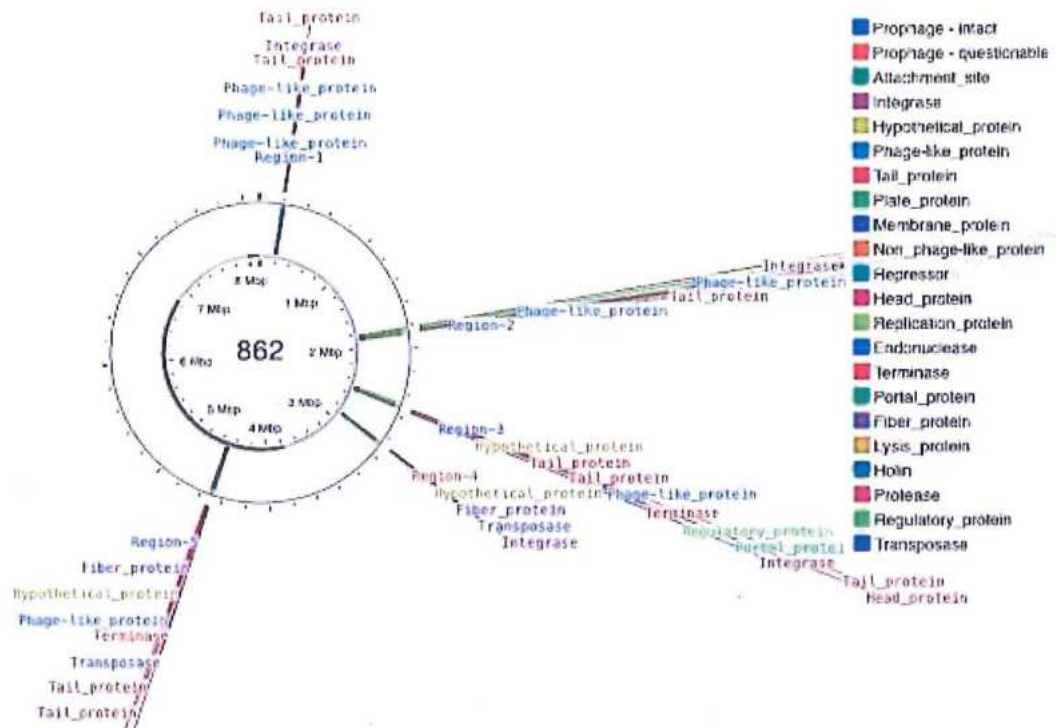
các prophage trong 899 và 1065 chứa chủ yếu các gene integrase và tail, gọi ý rằng chúng có thể là prophage ổn định và ít có khả năng tái kích hoạt. Đặc biệt, prophage của chủng 2027 mang nhiều gene transposase và recombinase, cho thấy chúng có thể đóng vai trò quan trọng trong việc trao đổi gene thông qua cơ chế chuyển gene ngang.

Bảng 3.9. Tổng hợp thông tin các vùng prophage của bốn chủng.

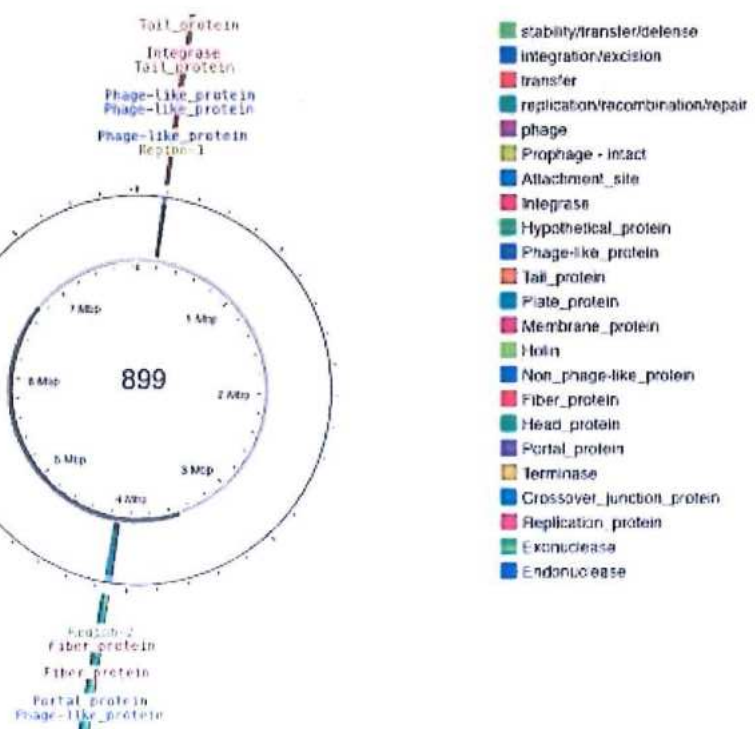
Chủng	862					899		1065		2027				
Tỷ lệ protein phage (%)	92.78					97.5		97.5		95.42				
Prophage ID	1	2	3	4	5	1	2	1	2	1	2	3	4	5
Kích thước	22.6 Kb	58.7 Kb	51.5 Kb	33.1 Kb	43.4 Kb	23 Kb	47.2 Kb	23 Kb	43.5 Kb	26.1 Kb	27.9 Kb	60.1 Kb	44.2 Kb	30.5 Kb
Độ hoàn chỉnh	Intact (120)	Intact (150)	Intact (150)	Questionable (90)	Intact (150)	Intact (120)	Intact (150)	Intact (120)	Intact (150)	Intact (120)	Intact (110)	Intact (150)	Intact (150)	Intact (150)
Contig chứa prophage	Contig 1	Contig 1	Contig 1	Contig 1	Contig 2	Contig 1	Contig 2	Contig 1	Contig 2	Contig 1	Contig 1	Contig 1	Contig 1	Contig 2
Vị trí trên genome	185576-208538	1817500-1876226	2484698-2536281	2865744-2898877	4480302-4523776	174151-197160	4099526-4146728	174151-197160	6604046-6647563	130419-156612	1682328-1710255	1712567-1772733	2399654-2443862	5291384-5321936
Chức năng prophage	integrase, tail, plate	integrase, capsid, terminase, portal	lysine, tail, capsid, protease	integrase, transposase, tail	transposase, portal, terminase	integrase, tail, plate	lysine, tail, structural, capsid	integrase, tail, plate	integrase, terminase, capsid	tail, plate, integrase	transposase, terminase, capsid	integrase, recombinase, transposase	lysine, tail, terminase, integrase	tail, head, portal
Phage phổ biến nhất	PHAGE_Burkho_p_hiE202_NC_009234	PHAGE_Salmon_EN34_NC_028699	PHAGE_Escher_v_B_EcoM_ECOO78_NC_041926	PHAGE_Escher_S_H2026Stx_1_NC_049919	PHAGE_Burkho_A_P3_NC_047752	PHAGE_Burkho_p_hiE202_NC_009234	PHAGE_Aeromo_v_B_AsaM_56_NC_019527	PHAGE_Burkho_p_hiE202_NC_009234	PHAGE_Aeromo_v_B_AsaM_56_NC_019527	PHAGE_Burkho_p_hiE202_NC_009234	PHAGE_Salmon_S_EN34_NC_028699	PHAGE_Salmon_S_EN34_NC_028699	PHAGE_Escher_v_B_EcoM_ECOO78_NC_041926	PHAGE_Burkho_K_S9_NC_013055

Hình 3.5. Sự phân bố của các vùng prophage ở 4 chủng BCC. A) 862, B) 899, C) 1065, D) 2027.

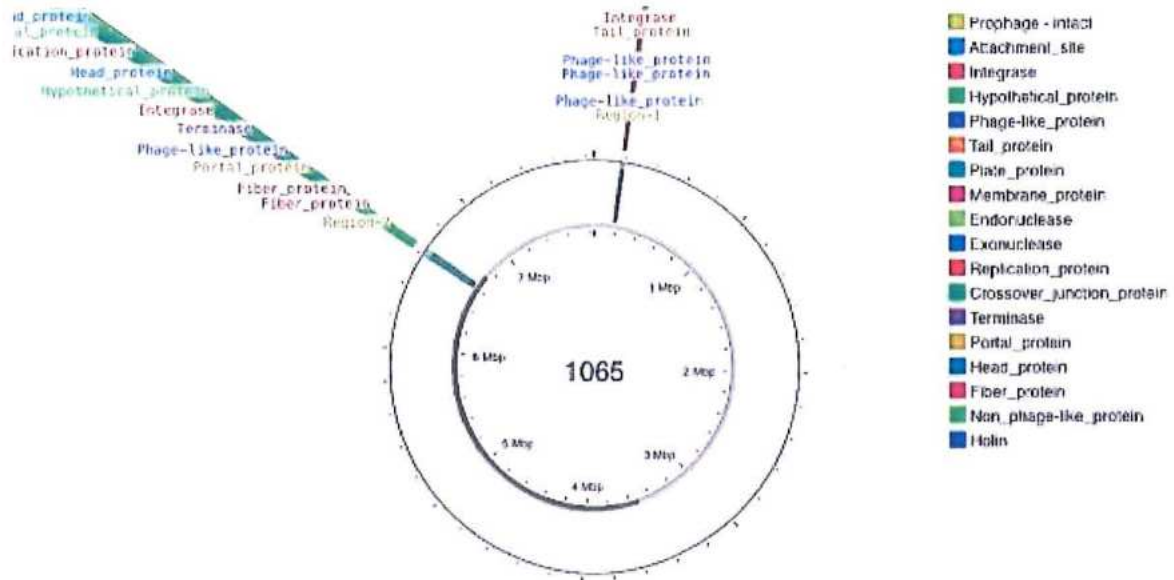
A)



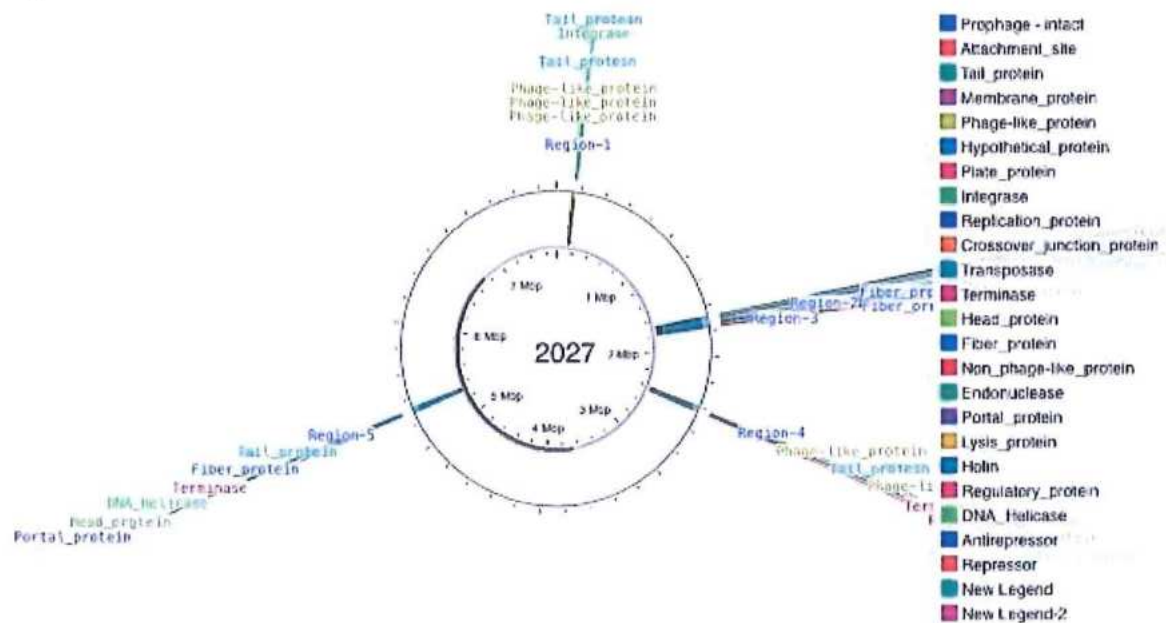
B)



C)



D)



Dữ liệu phân tích cũng cho thấy rằng một số prophage trong BCC có sự tương đồng cao với các bacteriophage đã được công bố trước đó, bao gồm phage của *Burkholderia*, *Salmonella* và *Escherichia coli*. Prophage phổ biến nhất trong cả bốn chủng có sự tương đồng cao với PHAGE_Burkho_phiE202_NC_009234, đặc biệt trên Contig 1 của các chủng 862, 899, 1065 và Contig 2 của 2027. Điều

này gợi ý rằng prophage này có thể là một thành phần được bảo tồn trong hệ gene của BCC và có vai trò nhất định trong tiến hóa của nhóm vi khuẩn này. PHAGE_Salmon_SEN34_NC_028699 xuất hiện trong các prophage của 862 và 2027, cho thấy khả năng có sự trao đổi di truyền giữa *Burkholderia* và *Salmonella* thông qua các sự kiện chuyển gene ngang. Tương tự, prophage tương đồng với PHAGE_Escher_vB_EcoM_ECOO78_NC_041926 được tìm thấy trong 862 và 2027, gợi ý rằng BCC có thể đã tiếp nhận các yếu tố di truyền từ *Escherichia coli*. Kết quả phân tích prophage trong genome của bốn chủng BCC đã làm sáng tỏ mức độ khác biệt giữa các chủng về số lượng, vị trí và đặc điểm chức năng của các prophage. Các prophage có mặt trong tất cả các chủng, nhưng sự khác biệt về kích thước và thành phần gene giữa các prophage cho thấy rằng một số prophage có thể vẫn còn hoạt động, trong khi những prophage khác đã bị bất hoạt trong quá trình tiến hóa. Chủng 862 và 2027 chứa nhiều prophage nhất, với kích thước lớn hơn và mang nhiều gene liên quan đến tái tổ hợp, cho thấy khả năng các prophage này có thể ảnh hưởng đến khả năng thích nghi của vi khuẩn. Trong khi đó, prophage trong 899 và 1065 có kích thước nhỏ hơn và mang ít gene tái tổ hợp, cho thấy chúng có thể là những prophage ổn định hơn, ít có khả năng tham gia vào các sự kiện chuyển gene ngang.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thiết lập quy trình giải trình tự và lắp ráp bộ gene hoàn chỉnh của bốn chủng *B. cenocepacia* bằng cách kết hợp dữ liệu đọc ngắn và dài. Tất cả các chủng đều mang ba nhiễm sắc thể, riêng chủng 862 có thêm một plasmid hoàn chỉnh. Phân tích phân loại cho thấy ba chủng thuộc hai kiểu gene đã biết (ST1697, ST2262), trong khi một chủng mang kiểu gene mới chưa từng được công bố và các kiểu gene này cũng chưa từng được phát hiện tại Việt Nam.

Các chủng *B. cenocepacia* mang nhiều hệ thống bơm đẩy đa thuốc và gene kháng các nhóm thuốc kháng sinh quan trọng như quinolone, macrolide và glycopeptide. Kiểu gene kháng thuốc phù hợp với kiểu hình kháng thuốc ghi nhận được, khẳng định các chủng này có đặc tính đa kháng đáng lo ngại.

Tất cả các chủng đều mang nhiều gene độc lực liên quan đến khả năng hình thành màng sinh học, hệ thống tiết protein và chuyển hóa cystein, góp phần quan trọng vào khả năng gây bệnh. Việc phát hiện từ 2–5 prophages trong mỗi bộ gene cho thấy vai trò của phage trong tiến hóa di truyền và lan truyền các yếu tố kháng thuốc, độc lực bằng con đường chuyển ngang. Dữ liệu giải trình tự thu được sẽ là nguồn tài nguyên quý giá cho các nghiên cứu di truyền và kiểm soát vi khuẩn bệnh viện tại Việt Nam.

KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu khai phá dữ liệu bộ gene các chủng *B. cenocepacia* để hiểu rõ hơn về các cơ chế phân tử gây bệnh chưa được công bố cũng như các con đường chuyển hoá hoạt chất quan trọng có thể ứng dụng trong y dược.

Áp dụng kết hợp cả 02 công nghệ giải trình tự NGS đoạn ngắn và đoạn dài và phát triển quy trình phân tích tin sinh chuyên biệt cho các tác nhân gây bệnh khác.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kenna D.T.D., Lilley D., Coward A., Martin K., Perry C., Pike R., Hill R., Turton J.F., 2017, Prevalence of *Burkholderia* species, including members of *Burkholderia cepacia* complex, among UK cystic and non-cystic fibrosis patients, *Journal of Medical Microbiology*, 66(4), pp. 490-501.
2. *Burkholderia cepacia* complex. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Burkholderia_cepacia_complex.
3. Isles A., Maclusky I., Corey M., Gold R., Prober C., Fleming P., Levison H., 1984, *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem, *Journal of Pediatrics*, 104(2), pp. 206-210.
4. Ko S., An H.S., Bang J.H., Park S.W., 2015, An outbreak of *Burkholderia cepacia* complex pseudobacteremia associated with intrinsically contaminated commercial 0.5% chlorhexidine solution, *American Journal of Infection Control*, 43(3), pp. 266-268.
5. Wiener-Well Y., Segonds C., Mazuz B., Kopuit P., Assous M.V., 2014, Successful outbreak investigation of *Burkholderia cepacia* complex bacteremia in intensive care patients, *American Journal of Infection Control*, 42(5), pp. 580-581.
6. Becker S.L., Berger F.K., Feldner S.K., Karliova I., Haber M., Mellmann A., Schäfers H.J., Gärtner B., 2018, Outbreak of *Burkholderia cepacia* complex infections associated with contaminated octenidine mouthwash solution, Germany, August to September 2018, *Euro Surveillance*, 23(42), 1800540.
7. Courtney J.M., Dunbar K.E.A., McDowell A., Moore J.E., Warke T.J., Stevenson M., Elborn J.S., 2004, Clinical outcome of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis adults, *Journal of Cystic Fibrosis*, 3(2), pp. 93-98.
8. Trần Minh Giao. Khảo sát đặc điểm nhiễm *Burkholderia cepacia* tại Bệnh viện Nhân Dân Gia Định. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2009;13(6):112.
9. Trương Thị Minh Diệu, Nguyễn Ngọc Anh, 2023, Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân nhiễm khuẩn huyết do vi khuẩn *Burkholderia cepacia* tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Thái Bình năm 2016–2020, *Tạp chí Y Dược Thái Bình*, 8, tr. 50–55.

10. Lauman P., Dennis J.J., 2021, Advances in Phage Therapy: Targeting the *Burkholderia cepacia* Complex, *Viruses*, 13(7), p. 1331.
11. Lord R., Jones A.M., Horsley A., 2020, Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2020(4), CD009529.
12. Illumina, 2024, Next-generation sequencing (NGS) technology, Illumina, <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html>.
13. Goodwin S., McPherson J.D., McCombie W.R., 2016, Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies, *Nature Reviews Genetics*, 17(6), pp. 333-351.
14. Wang M., 2021, Next-Generation Sequencing (NGS), *Clinical Molecular Diagnostics*, Pan S., Tang J. (eds), Springer, Singapore.
15. Bunkar N., Bhargava A., Chaudhury K., Sharma R. S., Lohiya N. K., Mishra P. K., 2018, Fetal nucleic acids in maternal plasma: from biology to clinical translation, *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 23(3), pp. 397-431.
16. Jain M., Olsen H. E., Paten B., et al., 2016, The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community, *Genome Biology*, 17, p. 239.
17. Coenye T., Mahenthiralingam E., Henry D., LiPuma J. J., Laevens S., Gillis M., Speert D. P., Vandamme P., 2001, *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 4), pp. 1481-1490.
18. Ragupathi N. K. D., Veeraraghavan B., 2019, Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: an update, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 18(1), p. 7.
19. Exner M., Bhattacharya S., Christiansen B., Gebel J., Goroncy-Bermes P., Hartemann P., Heeg P., Ilschner C., Kramer A., Larson E., Merckens W., Mielke M., Olthmanns P., Ross B., Rotter M., Schmithausen R.M., Sonntag H.G., Trautmann M., 2017, Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria?, *GMS Hygiene and Infection Control*, 12, Doc05.

20. Fung S.K., Dick H., Devlin H., Tullis E., 1998, Transmissibility and infection control implications of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis, *Canadian Journal of Infectious Diseases*, 9(3), pp. 177-182.
21. Bach E., Sant'Anna F.H., Dos Passos J.F.M., Balsanelli E., de Baura V.A., Pedrosa F.O., de Souza E.M., Passaglia L.M.P., 2017, Detection of misidentifications of species from the *Burkholderia cepacia* complex and description of a new member, the soil bacterium *Burkholderia catarinensis* sp. nov, *Pathogens and Disease*, 75(6).
22. Saroha T., Patil P.P., Rana R., Kumar R., Kumar S., Singhal L., Gautam V., Patil P.B., 2023, Genomic features, antimicrobial susceptibility, and epidemiological insights into *Burkholderia cenocepacia* clonal complex 31 isolates from bloodstream infections in India, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1151594.
23. Zhou J., Ren H., Hu M., Zhou J., Li B., Kong N., Zhang Q., Jin Y., Liang L., Yue J., 2020, Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Core Genome and the Underlying Recombination and Positive Selection, *Frontiers in Genetics*, 11, p. 506.
24. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B., 2014, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics*, 30(15), pp. 2114–2120
25. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., et al., 2012, SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing, *Journal of Computational Biology*, 19(5), pp. 455–477.
26. Peng Y., Leung H.C.M., Yiu S.M., Chin F.Y.L., 2012, IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth, *Bioinformatics*, 28(11), pp. 1420–1428.
27. Luo R., Liu B., Xie Y., Li Z., Huang W., Yuan J., et al., 2012, SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler, *GigaScience*, 1(1), p. 18.
28. Li D., Liu C.M., Luo R., Sadakane K., Lam T.W., 2015, MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph, *Bioinformatics*, 31(10), pp. 1674–1676.
29. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G., 2013, QUAST: quality assessment tool for genome assemblies, *Bioinformatics*, 29(8), pp. 1072–1075.

30. Zeiser E.T., Becka S.A., Wilson B.M., et al., 2019, Piperacillin-avibactam is a highly potent combination against multidrug-resistant *Burkholderia cepacia* complex and *Burkholderia gladioli* cystic fibrosis isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, 57(8), e00181-19.
31. Drevinek P., Mahenthiralingam E., 2010, *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence, *Clinical Microbiology and Infection*, 16(7), pp. 821–830.
32. Gautam V., Singh M., Singhal L., Kaur M., Kumar A., Ray P., 2012, *Burkholderia cepacia* complex in Indian cystic fibrosis patients, *Indian J Med Res*, 136(5), pp. 882–883.
33. Lee A.H.Y., Flibotte S., Sinha S., et al., 2017, Phenotypic diversity and genotypic flexibility of *Burkholderia cenocepacia* during long-term chronic infection of cystic fibrosis lungs, *Genome Research*, 27(4), pp. 650–662.
34. Mahenthiralingam E., Urban T.A., Goldberg J.B., 2005, The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex, *Nature Reviews Microbiology*, 3(2), pp. 144–156.
35. Agnoli K., Frauenknecht C., Freitag R., Schwager S., Jenul C., Vergunst A., Carlier A., Eberl L., 2014, The third replicon of members of the *Burkholderia cepacia* Complex, plasmid pC3, plays a role in stress tolerance, *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), pp. 1340–1348.
36. Guo L., Li G., Wang J., Zhao X., Wang S., Zhai L., Jia H., Cao B., 2017, Suspicious outbreak of ventilator-associated pneumonia caused by *Burkholderia cepacia* in a surgical intensive care unit, *American Journal of Infection Control*, 45(7), pp. 724–728.
37. Coenye T., 2010, Social interactions in the *Burkholderia cepacia* complex: biofilms and quorum sensing, *Future Microbiology*, 5(7), tr. 1087–1099
38. Bazzini S., Udine C., Sass A., Pasca M.R., Longo F., Emiliani G., Fondi M., Perrin E., Decorosi F., Viti C., Giovannetti L., Leoni L., Fani R., Buroni S., 2011, Deciphering the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*, *PLOS ONE*, 6(4), e18902.
39. Tseng S.-P., Tsai W.-C., Liang C.-Y., Lin Y.-S., Huang J.-W., Chang C.-Y., Tyan Y.-C., Lu P.-L., 2014, The Contribution of Antibiotic Resistance Mechanisms in Clinical *Burkholderia cepacia* complex isolates: An Emphasis on Efflux Pump Activity, *PLoS One*, 9(8):e104986.

40. Mohsen A., Park J., Chen Y.A., Kawashima H., Mizuguchi K., 2019, Impact of quality trimming on the efficiency of reads joining and diversity analysis of Illumina paired-end reads in the context of QIIME1 and QIIME2 microbiome analysis frameworks, *BMC Bioinformatics*, 20, p. 581.
41. Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E., 2017, Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads, *PLOS Computational Biology*, 13(6), e1005595.
42. Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hashimoto Y., et al., 1992, Proposal of *Burkholderia* gene. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* Palleroni and Holmes 1981 comb. nov., *Microbiol Immunol*, 36(12), pp. 1251–1275.
43. Hassan A.A., Coutinho C.P., Sa-Correia I., 2019, *Burkholderia cepacia* Complex Species Differ in the Frequency of Variation of the Lipopolysaccharide O-Antigen Expression During Cystic Fibrosis Chronic Respiratory Infection, *Front Cell Infect Microbiol*, 9, p. 273.
44. Jin Y., Zhou J., Zhou J., Hu M., Zhang Q., Kong N., et al., 2020, Genome-based classification of *Burkholderia cepacia* complex provides new insight into its taxonomic status, *Biol Direct*, 15(1), p. 6.

PHỤ LỤC

1. Đặc điểm lâm sàng các chủng *Burkholderia* spp. thu nhận từ Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

Mã số chủng	Năm sinh của bệnh nhân	Giới tính	Địa chỉ	Năm phân lập	Lý do nhập viện	Bệnh phẩm	Định danh bằng Maltidof
862	1948	Nam	Hai Bà Trung- Hà Nội	2021	Viêm phổi	Đờm	<i>Burkholderia cepacia</i>
899	1953	Nữ	Cửa Lò- Nghệ An	2021	Sốc nhiễm khuẩn, viêm màng não	Đờm	<i>Burkholderia cepacia</i>
1065	1946	Nam	Tây Hồ - Hà Nội	2021	Suy hô hấp do tràn khí màng phổi 2 bên	Đờm	<i>Burkholderia cepacia</i>
2027	1948	Nam	Phổ Yên - Thái Nguyên	2021	Suy hô hấp	Đờm	<i>Burkholderia cenocepacia</i>

2. Kết quả kháng sinh đồ các chủng *Burkholderia* spp.

Kháng sinh	Chủng <i>Burkholderia</i> spp.							
	899		862		2027		1065	
	Đường kính vòng ức chế (mm)	Diễn giải	Đường kính vòng ức chế (mm)	Diễn giải	Đường kính vòng ức chế (mm)	Diễn giải	Đường kính vòng ức chế (mm)	Diễn giải
amoxicillin/clavulanic acid (20/10µg)	0	R	0	R	0	R	0	R
aztreonam (30µg)	19	S	20	S	21	S	20	S
chloramphenicol (30µg)	21	R	21	R	12	R	25	I
Ceftazidime (30ug)	26	S	26	S	27	S	25	S
ciprofloxacin (5µg)	23	S	21	S	0	R	25	S
gentamicin (10µg)	0	R	0	R	0	R	0	R
cefotaxime (30µg)	0	R	0	R	0	R	0	R
clindamycin (2µg)	0	R	0	R	0	R	0	R
erythromycin (15µg)	0	R	0	R	0	R	0	R
ertapenem (10µg)	0	R	0	R	0	R	0	R
Nitrofuratoin (100ug)	0	R	0	R	0	R	0	R
cefepime (30µg)	12	R	14	R	9	R	18	I
FOSFOMYCIN/TROM ETAMOL (200UG)	0	R	0	R	0	R	0	R

cefoxitin (30 μ g)	0	R	0	R	0	R	0	R
imipenem (10 μ g)	13	R	13	R	19	R	14	R
levofloxacin (5 μ g)	22	S	21	S	0	R	22	S
meropenem (10 μ g)	16	R	17	I	21	S	25	S
norfloxacin (10 μ g)	17	S	17	S	0	R	19	S
ofloxacin (5 μ g)	17	I	16	R	0	R	16	R
oxacillin (5 μ g)	0	R	0	R	0	R	0	R
penicillin G (1UI)	0	R	0	R	0	R	0	R
Piperacillin(100ug)	24	S	28	S	27	S	32	S
pristinamycin (15 μ g)	14	R	16	R	11	R	14	R
trimethoprim/sulfameth oxazole (1.25/23.75 μ g)	21	S	13	R	19	S	22	S
tetracycline (30 μ g)	13	R	0	R	0	R	10	R
ticarcillin (75 μ g)	0	R	0	R	0	R	0	R
tobramycin (10 μ g)	0	R	0	R	0	R	0	R
piperacillin/tazobactam (100/10ug)	31	S	28	S	31	S	30	S
vancomycin (5 μ g)	0	R	0	R	0	R	0	R

Ghi chú: S (sensitive): nhạy cảm thuốc; R (resistant): Kháng thuốc; I
(intermediate-resistant): Kháng trung gian (kháng mức độ thấp)

Số: 182 /QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 08 tháng 04 năm 2025

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ

GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 364/QĐ-VHL ngày 01/03/2025 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 23/2021/TT-BGDĐT ngày 30/08/2021 của Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1966/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1899/QĐ-HVKHCN ngày 15/11/2022 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học đợt 2 năm 2022;

Căn cứ Quyết định số 210/QĐ-HVKHCN ngày 29/03/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và cử người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1052/QĐ-HVKHCN ngày 13/09/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc gia hạn thời gian học tập lần 1 cho học viên Kiều Duy Hùng;

Xét đề nghị của Trưởng khoa Sinh học, Trưởng phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Kiều Duy Hùng với đề tài: “Giải trình tự và phân tích bộ gene một số chủng vi khuẩn *Burkholderia* spp. đa kháng thuốc phân lập tại Bệnh viện 108 trong năm 2021 - 2022”

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận văn kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ.

Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký và phải đảm bảo thời hạn đào tạo theo quy định của Học viện. Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, Trưởng khoa Sinh học, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. /.

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ học viên;
- Lưu: VT, ĐT, MT.07.



GIÁM ĐỐC

GS.TS. Vũ Đình Lâm

Hà Nội, ngày 07 tháng 05 năm 2025

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 182/QĐ-HVKHCN ngày 08/04/2025 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Kiều Duy Hùng

Tên đề tài: Giải trình tự và phân tích bộ gene một số chủng vi khuẩn *Burkholderia* spp. đa kháng thuốc phân lập tại Bệnh viện 108 trong năm 2021 - 2022

Ngành/Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 07/05/2025 Hội đồng đã họp tại phòng họp 1710, A28, Học viện Khoa học và Công nghệ vào lúc 14 giờ 00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

1. PGS.TS. Nguyễn Trung Nam
2. TS. Đinh Thị Thu Hằng
3. PGS.TS. Nguyễn Hoàng Thịnh
4. PGS.TS. Lê Thị Nhi Công
5. PGS.TS. Nguyễn Mạnh Hà

- Chủ tịch hội đồng
Thư ký hội đồng
Phản biện 1
Phản biện 2
Ủy viên hội đồng

Thành viên vắng mặt:0..... (Phản biện hoặc ủy viên, đã có bản nhận xét đồng ý cho phép học viên được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ).

NỘI DUNG LÀM VIỆC

1. Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
2. Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
3. Thư ký HĐ, đọc lý lịch khoa học và bảng điểm của học viên
4. Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng

5. Phản biện 1: PGS. TS. Nguyễn Hoàng Thịnh

...Đề tài...đáp ứng...các...câu...của...một...lưu...văn...thạc...sĩ...
...Chức...các...nguyên...đồng...về...Burkholderia...ở...BV...108...Việt Nam...
...thường...pháp...các...viết...ngắn...gọn...về...đặc...trường...nguyên...cứu...cấp...thiết...
...về...phân...tích...chất...về...thực...hiện...các...số...phân...tích...sinh...học...các...chỉ...
...hiệu...về...phân...phân...phân...đánh...đánh...
...các...hình...các...lý...thuyết...ngắn...về...đoạn...đầu...như...thế...nào...
...

6. Phản biện 2: PGS Lê Thị Nhi Công

...Viết lại nội dung nghị quyết, thời hướng nghiên cứu, có 3 nội dung
nghiên cứu và hướng ứng với 3 kết luận, Format theo quy định
Đưa hàng qua trong phần K.D.C. thảo luận, trình bày lại
phần kết quả và thảo luận
Kết luận cần ngắn gọn, xác định, làm rõ nội dung nghị
Đã viết xong chính từ

7. Học viên trả lời:

Đáp ứng yêu cầu

8. Các thành viên HĐ và những người tham dự nêu câu hỏi

PGS.TS. Nguyễn Mạnh Hòa: ...cần phải theo đúng mẫu của Học viên
liều ý...phương pháp thiết quy chuẩn, thời gian tổng trạng
câu hỏi...chúng đang nghị có xu hướng thành công nhưng
trên th

PGS.TS. Nguyễn Trung Nam: ...bổ sung phần phương pháp, tài liệu TK
đồng viết, bổ sung bài: cần có BV 1.08 đã cung cấp mẫu, cần bổ

9. Học viên trả lời xong TTK cho tỉnh

Đáp ứng yêu cầu

10. Hội đồng họp kín và cho điểm

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên:

Trưởng ban: ...PGS.TS. Lê Thị Nhi Công

Ủy viên: ...PGS.TS. Nguyễn Mạnh Hòa

Ủy viên: ...TS. Đinh Thị Liên Hằng

- Kết quả kiểm phiếu như sau:

Số phiếu phát ra: ...05

Số phiếu thu về: ...05



Tổng số điểm:.....41,7.....

Điểm trung bình:8,3.....

Điểm thưởng công trình công bố:.....0.....

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố:.....8,3.....

- Kết luận của Hội đồng:

+ Luận vănĐạt yêu cầu..... (đạt/không đạt yêu cầu)

+ Tính không trùng lặp nội dung và tên đề tài với các công trình công bố:
.....Đề tài không trùng lặp với các nghiên cứu và ngoài nước.....
.....
.....

11. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

...Đề cương...thông tin về...Bac.khalderia...đ...BV.108/Viet Nam.
...Đề cương...học...2...Vật liệu và phương pháp nghiên cứu
...Phần kết quả và thảo luận cần làm gọn và hình ảnh lại
...Kết luận cần làm sát mức tiêu đề...dùng nghiên cứu
...Kể...đặt...chính...ta
Đề tài đáp ứng yêu cầu của một luận văn thạc sĩ, đề nghị
chỉnh sửa theo các góp ý của Hội đồng

Buổi họp đã kết thúc vào 16... giờ 45...phút, ngày 07/05/2025

Hà Nội, ngày 07 tháng 5 năm 2025

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG


Đinh Thị Lưu Hằng


Nguyễn Trọng Dân

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

KT. GIÁM ĐỐC

PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Thị Trung

NGHỆ VIÊN

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: ... Nguyễn Hoàng Thành ... Học hàm, học vị: PGS.TS
Chức danh trong Hội đồng: ... Phó Giáo sư ...
Cơ quan công tác: ... Học viện nông nghiệp Việt Nam ...
Họ và tên học viên: ... Kiều Bội Hương ...
Tên đề tài: ... Giai đoạn tiến và phân tích bộ gene một số chủng vi khuẩn ...
... *Burkholderia* spp ... đa kháng thuốc phân lập từ bệnh nhân 2021 - 2022 ...
Ngành: Sinh học thực nghiệm. Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Các vi khuẩn kháng sinh đang gây ra sự kháng thuốc trong điều trị bệnh trong đó có nhóm vi khuẩn *Burkholderia* spp. những chủng này có khả năng kháng vi khuẩn thuốc và có độc lực cao để kết quả hơn về mặt điều trị nên việc tìm hiểu về cơ chế kháng thuốc của các chủng này là điều rất cần thiết từ đó là cơ sở chọn thuốc để có thể làm giảm thiểu cho các chủng *Burkholderia* spp. sau này.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Các chủng vi khuẩn *Burkholderia* spp. đã phân lập tại VN từ đất và phân tích bằng kỹ thuật hiện tại, làm cho sự kháng thuốc của chúng trở nên rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo để tránh dẫn đến trùng lặp và rõ ràng, tránh bị đánh giá là trùng lặp.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Tên đề tài, nội dung nghiên cứu là phù hợp với chuyên ngành và mã số đào tạo.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Đã kết hợp cả q^2 và p^2 n/c thường quy và hiện đại trong n/c nên đảm bảo tính độ tin cậy và kết quả n/c đ

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

- Đã xác định xây dựng bộ gen tự do hoàn chỉnh của 4 chủng vi khuẩn *B. cereus* sp.
- Đã xác định được cấu trúc của 4 chủng vi khuẩn trên vùng gen tự do
- Đã xác định được các gen mã hóa hệ thống miễn dịch, kháng thể và các gen khác
- Xác định được các gen gây độc của 4 chủng
- Xác định được số lượng và vị trí các gen trên hệ gen của 4 chủng vi khuẩn

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

- Chưa tổng quan nên bổ sung thêm về công trình n/c về xây dựng, phân tích hệ gen của *B. cereus* sp.
- Chưa phân tích n/c của các gen khác để phân tích nguồn gốc liên quan các chủng
- Chưa phân tích n/c của các gen khác để phân tích nguồn gốc liên quan các chủng
- Chưa phân tích n/c của các gen khác để phân tích nguồn gốc liên quan các chủng

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Kết quả n/c của luận văn có thể viết thành bài báo khoa học để gửi đăng trên các tạp chí khoa học chuyên ngành

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

Kết quả việc luận văn đáp ứng yêu cầu của luận văn Thạc sĩ.

M.N..., ngày 28. tháng 04. năm 2025

Người nhận xét
(Ký, ghi rõ họ tên)

Thư
Nguyễn Hoàng Thinh.

Lưu ý:

- Nhận xét được làm thành 02 bản, có chữ ký của người nhận xét và gửi về phòng Đào tạo 02 ngày trước buổi bảo vệ.
- Địa chỉ liên hệ: CV. Nguyễn Thị Minh Tâm phòng Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội. ĐT02438689977- 0946082099

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Lê Thị Nhi Công Học hàm, học vị: PGS
Chức danh trong Hội đồng: TS
Cơ quan công tác: Viện Sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN
Họ và tên học viên: Kiều Dung Hùng
Tên đề tài: Nghiên cứu về phân tích bộ gene một số chủng vi khuẩn Burkholderia spp. đã kháng thuốc phân lập tại Bệnh viện 108
Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm. Mã số: 8 42 01 14 Trường năm 2021-22

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

..... Hiện nay tình trạng đa kháng thuốc ở vi sinh vật ngày càng phổ biến và gây ra nhiều hậu quả nghiêm trọng và ảnh hưởng tới sức khỏe con người. Để chủ động trong việc ngăn chặn sự phát tán, lây lan mầm bệnh, giúp phân tích sớm dịch bệnh thì việc hiểu biết về đặc điểm phân tử, đặc điểm bộ gene là rất quan trọng. Vì vậy, đề tài rất có ý nghĩa thời sự, khoa học và thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

..... Đề tài không bị trùng lặp với các công trình khoa học trước đây đã công bố trong và ngoài nước. Đề tài có trích dẫn đầy đủ các TLTK.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

..... Tên đề tài và nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành và mã số đào tạo.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Các phương pháp sử dụng trong nghiên cứu là hiện đại, phù hợp với nội dung nghiên cứu và có độ tin cậy, độ chính xác cao.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Luận văn đã có những kết quả phụ lục và đề tài nghiên cứu và đảm bảo về hàm lượng khoa học của luận văn. Kết quả đã thu được như sau:

- Đã xác định được khả năng kháng kháng sinh của 4 chủng vi khuẩn.

- Đã định danh bằng MALDI-TOF - MS rRNA và giải trình tự đoạn ngắn Illumina; xây dựng cây phát sinh loài.

- Đã phân tích đa dạng về tổ hợp trình tự vùng gen và phân tích đặc điểm của 4 chủng thuộc phức hợp *Burkholderia cepacia*.

- Đã xác định các biểu hiện kháng kháng sinh và gen độc lực.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

- Cần hoàn chỉnh lại luận văn cho sáng sủa, khoa học và logic.

- Phần vật liệu và phương pháp cần bổ sung lại chi tiết hơn.

- Phần kết quả và thảo luận cần làm gọn lại và trích bày lại. Đề nghị quản trong KQ & TL về TL TL.

- Luận cần ngắn gọn và súc tích và bám theo nội dung.

- Rà soát lỗi chính tả.

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

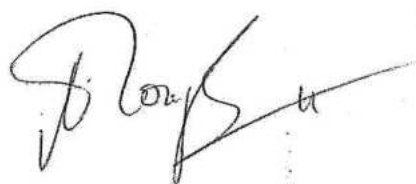
- Nội dung có thể đăng tải trên tạp chí khoa học, hội nghị, hội thảo.

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

..... Luận văn đã đáp ứng yêu cầu của 1 LV Ths và
..... có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Ths.
..... Tuy nhiên, cần chỉnh sửa như góp ý của Hội đồng.

Hà Nội, ngày 26 tháng 04, năm 2025

Người nhận xét
(Ký, ghi rõ họ tên)



Lê Thị Như Công

Lưu ý:

- Nhận xét được làm thành 02 bản, có chữ ký của người nhận xét và gửi về phòng Đào tạo 02 ngày trước buổi bảo vệ.
- Địa chỉ liên hệ: CV. Nguyễn Thị Minh Tâm phòng Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội. ĐT02438689977- 0946082099

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN
THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ tên học viên: Kiều Duy Hùng

Lớp: BIO2022B

Tên đề tài luận văn: Giải trình tự và phân tích bộ gene một số chủng vi khuẩn *Burkholderia Spp.* đa kháng thuốc phân lập tại Bệnh viện 108 trong năm 2021-2022.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

Người hướng dẫn khoa học:

Hướng dẫn 1: TS. Lê Thị Thu Hằng

Hướng dẫn 2: PGS. TS. Đồng Văn Quyền

Ngày bảo vệ luận văn: 7/5/2025

Căn cứ biên bản họp hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ, học viên đã chỉnh sửa luận văn như sau:

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	Bổ sung lời cảm ơn tới nơi cung cấp chủng vi khuẩn là Bệnh viện 108.	Đã bổ sung “Tôi xin gửi lời tri ân đến Khoa Vi sinh, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 đã hỗ trợ cung cấp các chủng vi khuẩn phân lập quý giá, là cơ sở quan trọng giúp tôi hoàn thành nghiên cứu này” (trang Lời cảm ơn).
2	Viết nghiêng tên latin chủng vi khuẩn	Đã thống nhất lại cách viết tên latin in nghiêng toàn luận văn: <i>Burkholderia spp.</i> , <i>B. cenocepacia</i> và <i>Burkholderia cepacia complex</i> .
3	Chỉnh sửa lại nội dung nghiên cứu ngắn gọn hơn trong phần Mở đầu.	Đã chỉnh lại nội dung ngắn gọn lại thành Nội dung 1, Nội dung 2, Nội dung 3.
4	Chỉnh sửa lại phần Mở đầu.	Viết lại phần Mở đầu. (Mở đầu, trang 1). Bỏ phần Kết quả nghiên cứu (Mở đầu, trang 2).
5	Tên hình để dưới hình.	Đã chỉnh lại tên và thứ tự ở dưới các



		hình 1.1, 1.2, 1.3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5.
6	Viết bổ sung chi tiết thông tin đối tượng và phương pháp nghiên cứu ở Chương 2.	Đã sửa phần 2.1.1. và 2.1.2, trang 16. Đã sửa phần 2.2.2. và 2.2.3., trang 17, 18. Đã bổ sung phần 2.2.5., trang 18.
7	Chuyển đổi bảng 3.1, 3.2 cũ thành phần phụ lục	Đã gộp lại thành Hình 3.1 tóm gọn lại kết quả. Đã bổ sung thêm phần Phụ lục Chuyển bảng 3.1, 3.2 cũ thành phần Phụ lục 1, Phụ lục 2. Đã chỉnh lại thứ tự bảng.
8	Thêm 2 bài báo trong nước trong phần Tổng Quan	Đã bổ sung thêm nghiên cứu trước đây của Bệnh viện Nhân Dân Gia Định và Bệnh viện ĐH Y Dược Thái Bình. Đã bổ sung trong phần Tài liệu tham khảo.
9	Chỉnh sửa phần Kết luận theo các nội dung nghiên cứu.	Đã chỉnh sửa lại phần Kết luận theo 3 nội dung nghiên cứu.

Hà Nội, ngày 14 tháng 5 năm 2025

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

HỌC VIÊN


Nguyễn Trung Nam


Lê Thị Thu Hằng

Đặng Văn Quyết
Học viên đã chỉnh sửa theo ý hội đồng


Kiều Duy Hưng

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

KT. GIÁM ĐỐC

PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Thị Trung

