

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----*-----

TRẦN THỊ MAI HÙNG

**THỰC TRẠNG KHÁNG KHÁNG SINH
CỦA MỘT SỐ VI KHUẨN THƯỜNG GẶP
Ở CỘNG ĐỒNG VÀ MỘT SỐ YẾU TỐ
LIÊN QUAN Ở VIỆT NAM NĂM 2018-2019**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y TẾ CÔNG CỘNG

HÀ NỘI – 2022

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----*

TRẦN THỊ MAI HÙNG

**THỰC TRẠNG KHÁNG KHÁNG SINH
CỦA MỘT SỐ VI KHUẨN THƯỜNG GẶP
Ở CỘNG ĐỒNG VÀ MỘT SỐ YẾU TỐ
LIÊN QUAN Ở VIỆT NAM NĂM 2018-2019**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y TẾ CÔNG CỘNG

Chuyên ngành: Y tế công cộng

Mã số: 62 72 03 01

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. Trần Huy Hoàng

2. PGS. TS. Dương Thị Hồng

HÀ NỘI – 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Trần Thị Mai Hưng, nghiên cứu sinh khóa 36, Viện vệ sinh dịch tễ Trung ương, chuyên ngành Y tế công cộng, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Trần Huy Hoàng và PGS.TS. Dương Thị Hồng.

2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày tháng năm 2022

Người viết cam đoan

Trần Thị Mai Hưng

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên tôi muốn bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Trần Huy Hoàng, Phó trưởng Khoa Vi khuẩn- Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, là người hướng dẫn khoa học, đã luôn giúp đỡ tôi, tận tình truyền đạt những kiến thức và kinh nghiệm quý báu, luôn động viên tinh thần để tôi có thể hoàn thành luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS. TS. Dương Thị Hồng, Phó Viện trưởng Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, là giáo viên đồng hướng dẫn, đã luôn nhiệt tình giúp đỡ, động viên tôi. Cô không chỉ truyền đạt kiến thức, kinh nghiệm mà cả những bài học trong cuộc sống trong suốt quá trình học tập và thực hiện nghiên cứu để tôi có thể hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc đến các đồng nghiệp, các anh chị và các bạn của Phòng thí nghiệm Kháng sinh, đồng nghiệp tại Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã quan tâm, giúp đỡ, hỗ trợ tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn chân thành tới Trung tâm Đào tạo và Quản lý Khoa học, Bộ môn Y tế công cộng của Viện. Các Thầy cô của Trung tâm và Bộ môn đã hướng dẫn, giúp đỡ tôi từ khi bắt đầu khoá học Nghiên cứu sinh, trong quá trình học tập và đến khi hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Lãnh đạo Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, các đồng nghiệp của Viện, các đồng nghiệp tại phòng Kế hoạch - Hợp tác quốc tế đã luôn giúp đỡ, động viên và tạo mọi điều kiện để tôi có đủ thời gian và trí tuệ hoàn thành luận án này.

Cuối cùng con xin khắc ghi công ơn sinh thành, nuôi dưỡng, dạy dỗ của cha mẹ hai bên gia đình và sự ủng hộ, động viên, thương yêu, chăm sóc, khích lệ của chồng, con và các anh, chị, em những người luôn ở bên tôi, là chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận án.

Hà Nội, ngày tháng năm 2022

Trần Thị Mai Hưng

Nghiên cứu được thực hiện sử dụng kinh phí của các đề tài/dự án:

Đề tài cấp nhà nước "Đánh giá thực trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn tại Việt Nam, xác định đặc điểm cấu trúc gen và yếu tố liên quan của các vi khuẩn kháng thuốc thường gặp ở Việt Nam" (Mã số: MOST: NHQT/SPDP/02.16) do TS. Trần Huy Hoàng chủ nhiệm.

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC HÌNH.....	xii
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	xi
DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ	xii
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1 . TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Kháng sinh và sự đề kháng kháng sinh	3
1.1.1. Lịch sử phát hiện kháng sinh và đề kháng kháng sinh	3
1.1.2. Định nghĩa:	5
1.2. Gánh nặng bệnh tật của vi khuẩn kháng kháng sinh và thực trạng kháng kháng sinh của một số vi khuẩn đáng quan tâm trên thế giới	9
1.2.1. Gánh nặng bệnh tật do kháng kháng sinh	9
1.2.2. Thực trạng vi khuẩn <i>Klebsiella pneumoniae</i> kháng thuốc	13
1.2.3. Thực trạng <i>Escherichia coli</i> kháng kháng sinh	20
1.3. Kiến thức của người dân về kháng sinh và sử dụng kháng sinh	29
1.4. Các kĩ thuật phát hiện kháng kháng sinh và các kĩ thuật sinh học phân tử sử dụng trong phát hiện các gen kháng kháng sinh.....	32
1.4.2.1. Kỹ thuật PCR phát hiện gen kháng kháng sinh	33
1.4.4.2. Kỹ thuật điện di xung trường (PFGE)	34
1.4.4.3. Kỹ thuật Southern blot phân tích hệ gen vi khuẩn.....	34
1.4.4.4. Phân tích các plasmid.....	34
1.4.4.5. Nghiên cứu khả năng truyền plasmid kháng kháng sinh	36
1.4.4.6. Kỹ thuật phân loại trình tự đa vị trí (Multi Locus Sequence Typing - MLST)	36
1.5. Vai trò của sinh học phân tử trong giải quyết các vấn đề y tế công cộng và nghiên cứu các vi khuẩn kháng kháng sinh	40
1.5.1. Vai trò của sinh học phân tử trong giám sát kháng kháng sinh	40
1.5.2. Vai trò của sinh học phân tử để xác định nguồn lây của vi khuẩn kháng kháng sinh.....	41
CHƯƠNG 2 . PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	49
2.1. Phương pháp nghiên cứu:	49
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	Error! Bookmark not defined.
2.1.2. Thời gian nghiên cứu:	50
2.1.3. Địa điểm nghiên cứu:.....	Error! Bookmark not defined.
2.1.4. Thiết kế nghiên cứu:	50

2.1.5. Cỡ mẫu: Áp dụng công thức tính cỡ mẫu cho một tỷ lệ:.....	50
2.1.6. Chọn mẫu:.....	51
2.1.7. Biến số nghiên cứu:	51
2.1.8. Kỹ thuật thu thập thông tin	52
2.1.9. Các kỹ thuật xét nghiệm áp dụng	56
2.1.10. Phương pháp Xử lý và phân tích số liệu:.....	69
2.1.11. Biện pháp khống chế sai số:	70
2.1.12. Kiểm soát tính chính xác và độ tin cậy của các kỹ thuật trong quá trình nghiên cứu.....	71
2.1.13. Đạo đức nghiên cứu.....	71
CHƯƠNG 3 . KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	73
3.1. Thông tin chung của đối tượng nghiên cứu.....	73
3.2. Tỷ lệ kháng kháng sinh của một số loại vi khuẩn thường gặp của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã một số tỉnh Việt Nam năm 2018-2019.....	75
3.2.1. Đặc điểm của một số loại vi khuẩn thường gặp phân lập được tại cộng đồng	75
3.2.2. Đặc điểm sinh học phân tử và kháng kháng sinh của vi khuẩn <i>E.coli</i> ..	76
3.2.3. Đặc điểm các gen kháng kháng sinh ở các chủng <i>E. coli</i> phân tích bằng kỹ thuật giải trình tự hệ gen (WGS)	85
3.2.4. Đặc điểm sinh học phân tử và kháng kháng sinh của các vi khuẩn <i>Klebsiella</i> spp.....	91
3.2.5. Một số yếu tố liên quan tới tỉ lệ mang gen kháng kháng sinh ở 2 chủng <i>E.coli</i> và <i>Klebsiella</i> spp.	102
3.3. Thực trạng kiến thức sử dụng kháng sinh của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã một số tỉnh Việt Nam năm 2018-2019.....	103
3.3.1. Kiến thức của đối tượng tham gia nghiên cứu về sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh	103
3.3.2. Thực trạng sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi	110
3.4. Mối liên quan về kiểu gen giữa các chủng vi khuẩn phân lập được từ nghiên cứu và với các chủng đang lưu.....	113
3.4.1. Mối liên quan về kiểu gen giữa các chủng <i>E. coli</i> phân lập được của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã và với các chủng đang lưu hành.....	113
3.4.2. Mối liên quan về kiểu gen giữa các chủng <i>Klebsiella</i> spp. phân lập được của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã và với các chủng đang lưu hành	118

CHƯƠNG 4 . BÀN LUẬN	119
4.1. Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn <i>E.coli</i> và <i>Klebsiella</i> spp....	119
4.1.1. Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn <i>E.coli</i>	119
4.1.2. Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn <i>Klebsiella</i> spp.	124
4.1.3. Một số yếu tố liên quan đến tình trạng mang gen KKS ở cộng đồng.	128
4.2. Thực trạng kiến thức và sử dụng kháng sinh của người bệnh và gia đình người bệnh đến khám tại trạm y tế xã	130
4.2.1. Kiến thức về kháng sinh và kháng kháng sinh của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã	130
4.2.2. Thực trạng sử dụng kháng sinh ở cộng đồng.....	132
4.3. Mối liên quan về kiểu gen của các chủng vi khuẩn phân lập được với các chủng đã từng phát hiện ra ở Việt Nam và trên thế giới.....	137
4.3.1. Mối liên quan về kiểu gen giữa các chủng vi khuẩn <i>E.coli</i> phân lập được trong nghiên cứu và với các vi khuẩn <i>E.coli</i> phân lập được tại Việt Nam và trên thế giới	137
4.3.2. Mối liên quan về kiểu gen giữa các chủng vi khuẩn <i>K.pneumonia</i> phân lập được trong nghiên cứu và với các vi khuẩn <i>K.pneumonia</i> phân lập được tại Việt Nam.....	141
4.4. Hạn chế của nghiên cứu và đề xuất nghiên cứu tiếp theo	145
4.5. Đóng góp của nghiên cứu	145
KẾT LUẬN.....	147
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI LUẬN ÁN	150
TÀI LIỆU THAM KHẢO	i

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Viết đầy đủ tiếng anh	Viết giải nghĩa tiếng việt
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ADN	Acid Deoxyribo Nucleic	Acid Deoxyribo Nucleic
BYT		Bộ Y tế
bp	Base pair	Đơn vị đo chiều dài của phân tử ADN
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Trung tâm Kiểm soát Bệnh tật
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute	Viện Tiêu chuẩn lâm sàng và Phòng xét nghiệm
COVID-19	Coronavirus disease 2019	Đại dịch Coronavirus 2019
CS	Colistin	Kháng sinh Colistin
CRAB	Carbapenem-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> kháng Carbapenem
CRE	Carbapenem-resistant <i>Enterobacterales</i>	<i>Enterobacterales</i> kháng Carbapenem
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBLs	Extended-spectrum β -lactamase	Enzyme ly giải vòng β -lactam phổ rộng
GLASS	Global Antimicrobial Resistance Surveillance System	Hệ thống giám sát kháng kháng sinh toàn cầu
ICU	Intensive Care Unit	Đơn vị chăm sóc đặc biệt
IMP	Imipenem-resistant <i>Pseudomonas</i>	
<i>K. Pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KS		Kháng sinh
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase	Enzyme carbapenemase phát hiện ở <i>K.pneumoniae</i>
MDR	Multiple drug resistance	Đa kháng thuốc

MIC	Minimal Inhibitory Concentration	Nồng độ kháng sinh tối thiểu ức chế sự phát triển của vi khuẩn
MLST	Multi Locus Sequence Typing	Phân loại trình tự đa vị trí
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> kháng Methicillin
NDM-1	New Delhi metallo- β -lactamase 1	
NST		Nhiễm sắc thể
OXA	Oxacillinase	Enzyme Oxacillinase ly giải carbapenem
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis	Điện di xung trường
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Trực khuẩn mủ xanh
SARS-CoV2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	Vi-rút Corona 2 gây suy hô hấp cấp tính nặng
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tụ cầu vàng
SDGs	Sustainable Development Goals	Mục tiêu Phát triển Bền vững
SHV	Sulphydryl variable enzyme	Enzyme sulphydryl ly giải kháng sinh phổ rộng
SMART	Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends	Nghiên cứu theo dõi xu hướng kháng kháng sinh
ST	Sequence Type	Loại trình tự gene
TCYTTG	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới
TEM	β -lactamases named after a Greek patient Temoneira	Enzyme β -lactamases được đặt theo tên của người bệnh người Hy Lạp
WGS	Whole Genome Sequence	Giải trình tự toàn bộ hệ gen vi khuẩn

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1: Phân loại kháng sinh	5
Bảng 1.2. Bảng tổng hợp gen kháng kháng sinh của các nhóm kháng sinh thường gặp	8
Bảng 1.3. Tỷ lệ <i>E. coli</i> sinh ESBLs ở một số bệnh viện	25
Bảng 1.4. Plasmid mang gen kháng kháng sinh [18, 19, 23, 26].....	35
Bảng 1.5. Chức năng và vị trí gen bảo tồn của <i>E. coli</i> MG1655 (Genbank số U00096) [152].....	36
Bảng 1.6. Một số kiểu trình tự ST của vi khuẩn <i>E. coli</i> . Nguồn: http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli	37
Bảng 2.1: Các câu hỏi đánh giá kiến thức về kháng sinh và kháng kháng sinh và tiêu chí đánh giá	53
Bảng 2.4. Các thành phần phản ứng PCR.....	60
Bảng 3.1. Thông tin chung của đối tượng nghiên cứu	73
Bảng 3.2. Điều kiện sinh hoạt của gia đình	74
Bảng 3.3. Phân bố các vi khuẩn theo loại bệnh phẩm ($n = 691$, $p < 0,001$)	75
Bảng 3.4. Đặc điểm nhân khẩu học của người mang chủng <i>E.coli</i> ($N = 237$).....	76
Bảng 3.5. Một số đặc điểm mang gen kháng kháng sinh của <i>E.coli</i> ($N=237$)	79
Bảng 3.6. Mức độ kháng đa thuốc của các <i>E. coli</i> ($n = 104$).....	84
Bảng 3.7. Đặc điểm các gen kháng kháng sinh của các chủng <i>E.coli</i> bằng kỹ thuật WGS	85
Bảng 3.8. Đặc điểm các gen kháng	89
Bảng 3.9. Đặc điểm nhân khẩu học người mang chủng <i>Klebsiella</i> spp. ($N = 51$)	91
Bảng 3.10. Một số đặc điểm mang gen KKS của <i>Klebsiella</i> spp. ($N=51$).....	93
Bảng 3.11. Một số đặc điểm mang gen kháng kháng sinh của <i>Klebsiella</i> spp. theo nhóm triệu chứng của đối tượng mang gen kháng kháng sinh ($n=51$)	94
Bảng 3.12. Mức độ đa kháng của <i>Klebsiella</i> spp. ($N = 51$)	98
Bảng 3.13. Đặc điểm các gen kháng thuốc của <i>Klebsiella</i> spp. và <i>K.pneumoniae</i> qua phân tích WGS.....	99
Bảng 3.14. Đặc điểm kháng với các loại kháng sinh của các chủng <i>K.pneumoniae</i> phân tích NGS	101
Bảng 3.15. Một số yếu tố liên quan tới đặc điểm không mang gen kháng ở 2 chủng <i>E.coli</i> và <i>Klebsiella</i> spp. ($n = 279$); n (%)	102
Bảng 3.16. Mức độ kiến thức sử dụng KS của đối tượng nghiên cứu theo ba miền ($n=1432$).....	103
Bảng 3.17. Kiến thức đúng về sử dụng kháng sinh theo miền	103
Bảng 3.18. Thực trạng sử dụng kháng sinh của đối tượng trong vòng 3 tháng trước thời điểm nghiên cứu theo 3 miền ($n=1432$)	107
Bảng 3.19. Thực trạng sử dụng kháng sinh của gia đình đối tượng trong vòng 3 tháng trước nghiên cứu theo 3 miền ($n=1432$)	108
Bảng 3.20. Thực trạng sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi theo 3 miền ($n=1432$)	110
Bảng 3.21. Loại plasmid và số lượng plasmid xuất hiện trong các chủng <i>E.coli</i>	114
Bảng 3.22. Đặc điểm các gen KKS ở các chủng <i>Klebsiella</i> spp. phân tích bằng kỹ thuật giải trình tự hệ gen (NGS)	118
Bảng 3.23. Đặc điểm plasmid của các chủng <i>Klebsiella</i> spp.....	120

DANH MỤC CÁC HÌNH

<i>Hình 1.1. Khoảng cách về thời gian kháng sinh được bắt đầu sử dụng và thời gian phát hiện kháng.....</i>	<i>4</i>
<i>Hình 1.2: Cơ chế tác dụng của kháng sinh [3].....</i>	<i>7</i>
<i>Hình 1.3: Tử vong do vi khuẩn kháng kháng sinh và liên quan đến vi khuẩn kháng kháng sinh theo khu vực [190].....</i>	<i>11</i>
<i>Hình 1.4: Tử vong toàn cầu do và liên quan đến vi khuẩn kháng kháng sinh theo tác nhân, 2019 [190].....</i>	<i>12</i>
<i>Hình 1.5. Dấu hiệu nhận biết sự xuất hiện và lây lan của K. pneumoniae đa kháng và toàn kháng và các gen kháng thuốc [69].....</i>	<i>14</i>
<i>Hình 1.6. Phân bố các chủng sinh enzyme KPC trên thế giới [156].</i>	<i>17</i>

DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Tỷ lệ vi khuẩn <i>E.coli</i> phân lập được và sinh ESBLs theo nhóm bệnh.....	78
Biểu đồ 3.2. Tỷ lệ <i>E.coli</i> mang gen kháng kháng sinh (N=237).....	78
Biểu đồ 3.3. Đặc điểm mang gen sinh ESBLs của vi khuẩn <i>E.coli</i> (n = 237)	80
Biểu đồ 3.4. Một số đặc điểm mang gen sinh ESBLs của vi khuẩn <i>E.coli</i> theo nhóm triệu chứng của đối tượng (n=136).....	81
Biểu đồ 3.5. Tỷ lệ kháng của các chủng <i>E.coli</i> (N = 104) với các loại kháng sinh	82
Biểu đồ 3.6. Tỷ lệ kháng của các vi khuẩn <i>E.coli</i> (N = 104) với các loại kháng sinh theo miền. (*): $p < 0,05$	83
Biểu đồ 3.7. Đặc điểm kháng của <i>E.coli</i> theo loại nhiễm khuẩn (n = 104).....	83
Biểu đồ 3.8. Đặc điểm của blaCTX-M	89
Biểu đồ 3.9. Đặc điểm mang gen kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn <i>Klebsiella</i> spp. (N=51).....	95
Biểu đồ 3.10. Tỷ lệ kháng của các chủng <i>Klebsiella</i> spp. (N = 51) với các loại kháng sinh	96
Biểu đồ 3.11. Tỷ lệ kháng của các <i>Klebsiella</i> spp. (N = 51) với các loại KS theo miền. (*): $p < 0,05$	97
Biểu đồ 3.12. Tỷ lệ kháng của các <i>Klebsiella</i> spp. (N = 51) với các loại kháng sinh theo loại nhiễm khuẩn	98
Biểu đồ 3.13. Kiến thức của đối tượng nghiên cứu về kháng sinh và kháng kháng sinh	105
Biểu đồ 3.14. Cách thức sử dụng kháng sinh theo 3 miền (n = 259; $p < 0,001$)	108
Biểu đồ 3.15. Tỷ lệ sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi.....	111
Biểu đồ 3.16. Mục đích sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi	111
Biểu đồ 3.17. Cách thức sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi. (**) $p < 0,001$	112
Biểu đồ 3.18. Sự đa dạng STs của chủng <i>E.coli</i>	113
Biểu đồ 3.19. Số lượng plasmid của các chủng <i>E.coli</i> phân lập được.....	114
Biểu đồ 3.20. Cây phát sinh loài thể hiện mối liên hệ về mặt di truyền của các chủng nghiên cứu và biểu đồ nhiệt thể hiện kiểu gen của các chủng <i>E. coli</i> mang gen sinh ESBLs phân lập.....	116

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tổ chức Y tế Thế giới (TCYTTG) nhận định kháng kháng sinh là một trong mười mối đe dọa về sức khỏe, sự phát triển và an ninh y tế toàn cầu. Việc phát hiện ra penicillin và các kháng sinh khác là một tiến bộ y học quan trọng trong thế kỷ qua. Tuy nhiên sau đó là sự xuất hiện của các vi khuẩn làm giảm tác dụng của các thuốc kháng sinh. Sự xuất hiện nhanh của các vi khuẩn kháng với các loại kháng sinh mới ra đời dẫn đến việc các nhà sản xuất không đầu tư để nghiên cứu và sản xuất các loại kháng sinh do hiệu quả kinh tế thấp. Hơn nữa ở các quốc gia đang phát triển, thiếu các biện pháp can thiệp nhằm kiểm soát tình trạng vi khuẩn kháng với các loại kháng sinh. Những điều này có thể dẫn chúng ta quay lại một kỷ nguyên không kháng sinh [284].

Vi khuẩn kháng kháng sinh gây ra gánh nặng bệnh tật và kinh tế lớn trên phạm vi toàn cầu. Số liệu ước tính vào năm 2019, trên toàn cầu sẽ có 1,27 triệu ca tử vong do vi khuẩn kháng thuốc và 4,95 triệu ca tử vong có liên quan đến vi khuẩn kháng kháng sinh [191]. Báo cáo giám sát mới nhất của TCYTTG năm 2021 cho thấy *E. coli* và *K.pneumoniae* là hai trong số các tác nhân kháng kháng sinh phổ biến nhất và là hai tác nhân có tỷ lệ đa kháng, nhiễm trùng huyết rất cao ở cả cộng đồng và bệnh viện. Đây là gánh nặng bệnh tật và kinh tế của toàn cầu, đặc biệt các quốc gia đang phát triển. Tuy nhiên hầu hết số liệu về vi khuẩn kháng kháng sinh mới chỉ tập trung giám sát và nghiên cứu ở bệnh viện [210].

Việt Nam là một các quốc gia có tình trạng kháng kháng sinh trầm trọng. Một trong những lý do chính là do sử dụng kháng sinh không kiểm soát tại cộng đồng và trong chăn nuôi [285]. Trong những năm qua Việt Nam đã có những quan tâm nhất định đến kiểm soát kháng kháng sinh. Bộ Y tế đã phê duyệt Kế hoạch hành động quốc gia về chống kháng thuốc giai đoạn 2013-2020 và đang xây dựng Chiến lược phòng chống kháng thuốc giai đoạn 2022-2030. Tuy nhiên việc đầu tư nguồn lực cũng như chiến lược trong việc giám sát và quản lý kháng kháng sinh chưa được thực hiện một cách đồng bộ. Hiện tại, Việt Nam chưa có nhiều số liệu đánh giá mức độ kháng kháng sinh trong cộng đồng, các số liệu hiện có thường của các nghiên cứu với địa điểm nghiên cứu nhỏ hẹp, không ước lượng được mức độ và gánh nặng của kháng kháng sinh. Chúng ta cũng chưa có nhiều nghiên cứu yếu tố liên quan đến sự phát triển của vi khuẩn kháng kháng sinh như

kiến thức, thực hành về sử dụng kháng sinh ở người và trong chăn nuôi. Vậy chúng ta cần đi tìm câu trả lời cho câu hỏi: Thực trạng kháng kháng sinh của các vi khuẩn nhiễm khuẩn tại cộng đồng ở Việt nam hiện nay ở mức độ nào?” Chính vì sự cần thiết và ý nghĩa thực tiễn đã nêu ở trên chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu ***“Thực trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn ở cộng đồng và các yếu tố liên quan ở Việt Nam, năm 2018-2019”***. Để đảm bảo mức độ đại diện, nghiên cứu cần thực hiện tại một số địa phương của cả 3 miền Bắc, Trung và miền Nam. Các kết quả của nghiên cứu sẽ góp phần định hướng trong việc xác định ưu tiên, mức độ của vấn đề để đưa ra các chính sách, kế hoạch hành động và can thiệp phù hợp trong giai đoạn 2020-2030. Nghiên cứu được thực hiện với các mục tiêu như sau:

1. Xác định tỷ lệ và đặc điểm kháng kháng sinh của một số loại vi khuẩn thường gặp của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã một số tỉnh Việt Nam, 2018-2019.
2. Mô tả thực trạng kiến thức và sử dụng kháng sinh của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã một số tỉnh Việt Nam, 2018-2019.
3. Xác định mối liên quan kiểu gen của một số chủng vi khuẩn kháng kháng sinh phổ rộng phân lập được từ người bệnh đến khám tại trạm y tế xã một số tỉnh Việt Nam, 2018-2019.

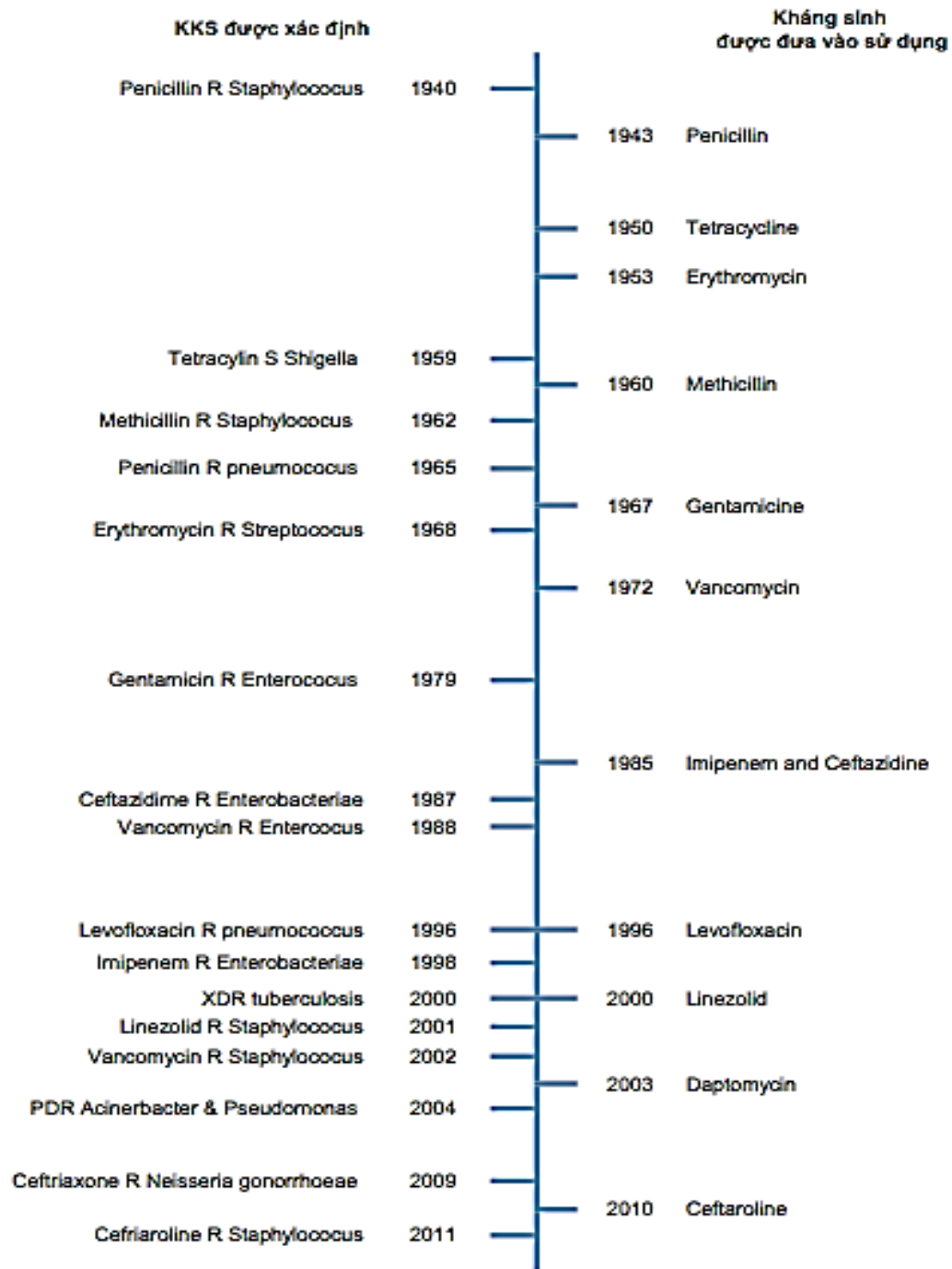
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Kháng sinh và sự đề kháng kháng sinh

1.1.1. Lịch sử phát hiện kháng sinh và đề kháng kháng sinh

Trước đầu thế kỷ 20, các cách điều trị nhiễm trùng chủ yếu dựa trên các phương pháp y học dân gian. Các quan sát được thực hiện trong phòng thí nghiệm về kháng sinh giữa các vi sinh vật đã đưa đến những phát hiện về các kháng sinh tự nhiên được tạo ra từ vi sinh vật. Năm 1895, Vincenzo Tiberio, nhà vật lý học ở đại học Naples đã phát hiện rằng nấm mốc (*Penicillium*) trong nước có hoạt động kháng khuẩn tốt. Sau khi hợp chất hóa trị ban đầu tỏ ra có hiệu quả, những hợp chất khác cũng được theo đuổi cùng dòng điều trị, nhưng nó không được thực hiện cho đến năm 1928 khi Alexander Fleming quan sát kháng sinh chống lại vi khuẩn từ một loài nấm trong *Penicillium*. Đến năm 1941, kháng sinh đầu tiên là penicilin đã được sản xuất để dùng trong lâm sàng điều trị các bệnh nhiễm trùng và cho đến nay các kháng sinh vẫn là vũ khí tối ưu nhất chống lại các bệnh nhiễm trùng.

Tuy nhiên ngay sau khi phát hiện kháng sinh là sự xuất hiện sự đề kháng của vi khuẩn. Đã có một số cảnh báo đã được nhắc tới trước khi kháng sinh được sử dụng phổ biến. Bài phát biểu tại lễ nhận giải Nobel của Alexander Fleming đã được viện dẫn nhiều lần như một lời cảnh báo của ông rằng “Không khó để tạo ra một vi khuẩn kháng thuốc penicillin trong phòng thí nghiệm bằng cách cho chúng tiếp xúc với một lượng không đủ để giết chết chúng...đó là một điều nguy hiểm mà một người đã có thể sử dụng dưới liều, và vi khuẩn của người đó đã tiếp xúc với một lượng thuốc không đủ giết chết chúng và làm chúng kháng” [15]. Vài năm sau khi kháng sinh được giới thiệu, các vi khuẩn phát triển cơ chế để chống lại kháng sinh đã được sử dụng. Vi khuẩn có một số cách chia sẻ vật liệu di truyền, đôi khi không liên quan đến loài, và dẫn đến việc càng mở rộng các chủng kháng kháng sinh. Khoảng cách thời gian là rất ngắn giữa việc giới thiệu một loại kháng sinh được sử dụng và thời điểm kháng của nó với các vi khuẩn khác nhau (Hình 1), do đó việc nghiên cứu cơ chế kháng và cơ chế di truyền của chúng là một trong những ưu tiên quan trọng trong chiến lược giảm tốc độ và tác động của kháng thuốc.



Hình 1.1. Khoảng cách về thời gian kháng sinh được bắt đầu sử dụng và thời gian phát hiện kháng

1.1.2. Định nghĩa:

1.1.2.1 Kháng sinh và phân loại kháng sinh [2]

- Kháng sinh: kháng sinh là những chất do vi sinh vật tiết ra hoặc những chất hóa học bán tổng hợp, tổng hợp, với nồng độ rất thấp, có khả năng đặc hiệu kìm hãm sự phát triển hoặc diệt được vi khuẩn.
- Phân loại kháng sinh: Cho đến nay, khoa học đã tìm ra rất nhiều các nhóm kháng sinh mà mỗi nhóm có tác dụng tốt trên những loại vi khuẩn khác nhau. Dựa theo cấu trúc hóa học, kháng sinh được phân loại thành các nhóm chính sau:

Bảng 1.1: Phân loại kháng sinh

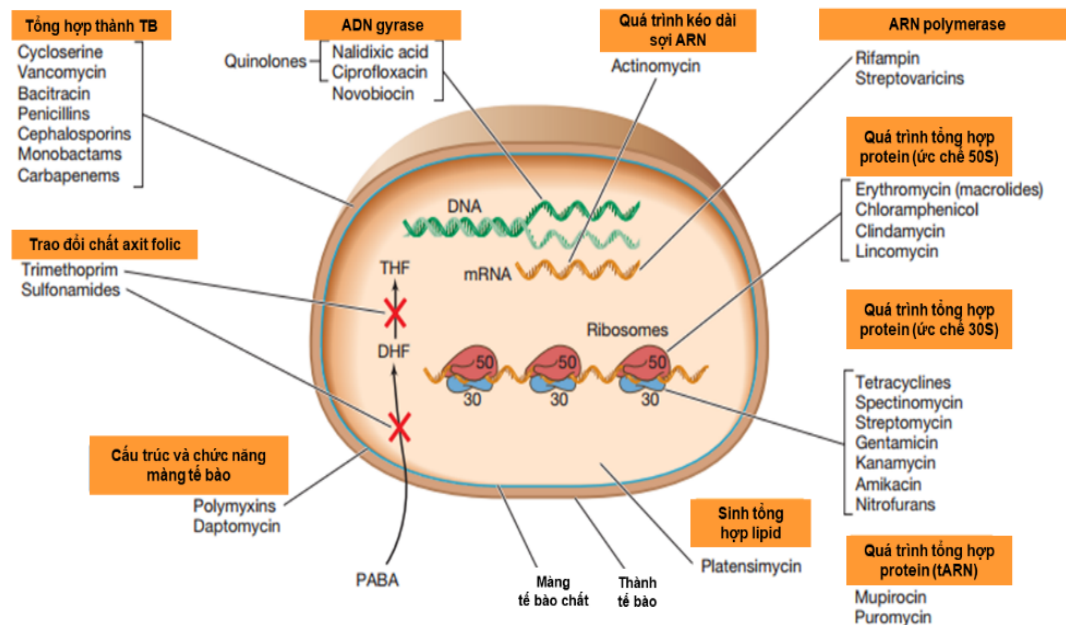
STT	Nhóm cấu trúc	Tên thuốc	Tác dụng
1	Nhóm β-lactam:		
	Peniciline	Penicilin V, penicilin G, methicilin, oxacilin, amoxicilin, nhóm penicilin	Cầu khuẩn Gram dương, Gram âm,
	Cephalosporin	Cephalosporin thế hệ 1,2,3,4,5	Gram dương, Gram âm
	Carbapenem	Imipennem, meropenem, doripenem, ertapenem	Tác dụng rộng trên cả vi khuẩn kỵ khí và hiếu khí, vi khuẩn gram dương
	Monobactam	Aztreonam	Vi khuẩn hiếu khí gram âm và vi khuẩn kỵ khí
	Ức chế β-lactamase	Acid clavulanic, sulbactam và tazobactam	Ức chế các vi khuẩn tiết men beta-lactamase như Acinetobacter.
2	Aminoglycosid	Kanamycin, gentamicin, neltimicin, tobramycin, amikacin.	Vi khuẩn gram âm
3	Nhóm Macrolid	Erythromycin, oleandomycin, roxithromycin, clarithromycin, dirithromycin, azithromycin, spiramycin, josamycin	Các vi khuẩn gram dương và một số vi khuẩn không điển hình

4	Nhóm lincosamid	Lincomycin và clindamycin	Các vi khuẩn gram dương và một số vi khuẩn không điển hình
5	Nhóm phenicol	Cloramphenicol và thiamphenicol	Cả gram âm và gram dương
6	Nhóm cyclin	Chlortetracyclin, oxytetracyclin, demeclocyclin, methacyclin, doxycyclin, minocyclin.	Có phổ kháng khuẩn rộng trên cả các vi khuẩn Gram-âm và Gram-dương, cả vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí
7	Nhóm peptid	Glycopeptid (vancomycin, teicoplanin):	Chủ yếu trên các chủng vi khuẩn Gram-dương
		Polypeptid (polymyxin, colistin)	Trực khuẩn Gram-âm
		Lipopeptid (daptomycin)	Gram-dương hiếu khí và kỵ khí
8	Nhóm quinolon	4 thế hệ quinolon	Không có nguồn gốc tự nhiên, toàn bộ được sản xuất bằng tổng hợp hóa học.
9	Các nhóm kháng sinh khác	Nhóm co-trimoxazon, nhóm 5-nitro-imidazon, nhóm oxazolidion	

1.1.2.2 Cơ chế sự đề kháng kháng sinh [3]

Sau khi vào tế bào, kháng sinh được đưa tới đích tác động sẽ phát huy tác dụng bằng cách:

- Ức chế sinh tổng hợp vách tế bào vi khuẩn
- Gây rối loạn chức năng màng nguyên tương, đặc biệt là chức năng thẩm thấu chọn lọc, làm cho các thành phần (ion) bên trong tế bào bị thoát ra ngoài, ví dụ nhóm polymyxin, Daptomycin
- Ức chế sinh tổng hợp protein
- Ức chế sinh tổng hợp acid nucleic
- Ức chế sinh tổng hợp các chất chuyển hoá cần thiết cho tế bào



Hình 1.2: Cơ chế tác dụng của kháng sinh [3]

Kháng sinh có tác dụng ức chế hoặc tiêu diệt vi khuẩn, nhưng khi trong môi trường có kháng sinh mà vi khuẩn vẫn phát triển thì được coi là sự đề kháng kháng sinh.

Phân loại đề kháng kháng sinh

Có 2 loại đề kháng: là đề kháng giả và đề kháng thật

- Đề kháng giả: Đề kháng giả là có biểu hiện là đề kháng nhưng không phải là bản chất, tức là không do nguồn gốc di truyền. Khi vào trong cơ thể, tác dụng của kháng sinh phụ thuộc vào ba yếu tố là kháng sinh - người bệnh - vi khuẩn. Đề kháng giả có thể do một trong ba yếu tố hoặc có thể kết hợp hai hay thậm chí cả ba yếu tố

- Đề kháng thật: có 2 loại là đề kháng tự nhiên và đề kháng thu được.

+ Đề kháng tự nhiên do một số loài vi khuẩn không chịu tác dụng của một số kháng sinh nhất định. Ví dụ *P. aeruginosa* không chịu tác dụng của penicilin G, *Staphylococcus aureus* không chịu tác dụng của colistin. Hoặc vi khuẩn không có vách như *Mycoplasma* không chịu tác dụng của các kháng sinh beta-lactam ức chế sinh tổng hợp vách. Đề kháng tự nhiên thường mang tính chất đặc trưng theo từng loại vi khuẩn.

- Đề kháng thu được do một biến cố di truyền là đột biến hoặc nhận được gen đề kháng để một vi khuẩn đang từ không có gen đề kháng trở thành có gen đề

kháng, nghĩa là đang nhạy cảm trở thành có khả năng đề kháng kháng sinh. Các gen đề kháng có thể nằm trên một, một số hoặc tất cả các thành phần di truyền của vi khuẩn gồm nhiễm sắc thể, plasmid và transposon. Đề kháng thu được thường mang tính chất của từng cá thể trong loài.

Đề kháng thu được là yếu tố đóng vai trò chính trong việc gia tăng tình hình kháng kháng sinh hiện nay. Các nghiên cứu về kháng kháng sinh của vi khuẩn luôn tập trung phân tích những biến đổi về mặt di truyền của vi khuẩn do đề kháng thu được làm thay đổi tính đề kháng của vi khuẩn như thế nào.

Các gen kháng kháng sinh nhóm β -lactam

Gen kháng kháng sinh đã tồn tại từ rất lâu, các gen này rất phong phú và đa dạng trong các sinh vật sống cổ đại, được phát hiện trong ADN được phục hồi từ Pleistocene tiền sử (30.000 năm trước) [22]. Cho đến nay hàng chục nghìn gen kháng kháng sinh đã được phát hiện làm tăng sự hiểu biết về các cơ chế đề kháng của vi khuẩn.

Bảng 1.2. Bảng tổng hợp gen kháng kháng sinh của các nhóm kháng sinh thường gặp

STT	Nhóm KS	Các gen kháng kháng sinh quan trọng
1.	β -lactam	○ AmpC- β-lactamase ○ ESBL: <i>bla</i>TEM-, <i>bla</i>SHV-, <i>bla</i>CTX-M- ○ Carbapenemase: Nhóm A (KPC, SME, IMI, NMC, GES); Nhóm B (NDM, IMP, VIM, SPM, GIM); Nhóm D (OXA-)
2.	Aminoglycosid	○ Gen methlase: <i>armA</i>, <i>npmA</i>, <i>rmtA</i>, <i>rmtB</i>, <i>rmtC</i> và <i>rmtD</i> ○ Gen tạo các enzyme biến đổi: AAC (acetyltransferase), ANT (nucleotidytransferase/adenyltransferase), APH (phosphotransferase)
3.	Chloramphenicol	○ CAT: <i>catA</i> và <i>catB</i> ○ <i>cmlA</i> và <i>floR</i>
4.	Glycopeptid	○ <i>VanA</i> và <i>vanB</i>: nằm trên plasmid hoặc chromosom

	○ <i>vanC1</i> , <i>vanC2/3</i> , <i>vanD</i> , <i>vanE</i> và <i>vanG</i> : chỉ nằm trên chromosom
5. Quinolon	○ GyrA và GyrB ở trực khuẩn gram âm; <i>parC</i> và <i>parE</i> ở vi khuẩn gram dương đều nằm trên chromosom ○ Qnr (<i>qnr A</i> , B, C, D, S), <i>aac(6)-ib</i> , <i>qepA</i> nằm trên plamid
6. Sulfanamid và trimethoprim	○ Kháng sulfonamid: <i>folP</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> và <i>sul3</i> ○ Kháng trimethoprim: <i>folA</i> , <i>dfrA</i> , <i>dfrB</i> , <i>dfrK</i>

Các gen kháng kháng sinh của các nhóm kháng sinh khác nhau rất đa dạng bao gồm cả các gen nằm trên chromosom và trên plasmid. Đặc biệt các gen nằm trên plasmid đóng vai trò lớn trong việc gia tăng nhanh chóng tốc độ lan truyền các gen kháng kháng sinh trong quần thể vi khuẩn do tính chất có thể lây truyền ngang từ loài vi khuẩn này sang vi khuẩn khác. Chính vì vậy việc xác định các gen kháng kháng sinh đóng vai trò rất quan trọng trong việc kiểm soát sự lan truyền kháng kháng sinh hiện nay.

Vi khuẩn đa kháng - MDR (MultiDrug Resistance): Đa kháng thuốc có nghĩa là tác nhân được phân lập đề kháng với ít nhất một kháng sinh ở ít nhất ba nhóm kháng sinh.

Kháng thuốc mở rộng - XDR (Extensive Drug Resistance): Kháng thuốc mở rộng là tác nhân được phân lập đề kháng với ít nhất một kháng sinh ở tất cả các nhóm nhưng vẫn còn nhạy với một hoặc hai lớp kháng sinh hiện có.

Toàn kháng thuốc - PDR (PanDrug Resistance): Toàn kháng là tác nhân được phân lập đề kháng với tất cả các kháng sinh ở tất cả các lớp kháng sinh hiện có [171].

Nhiễm trùng do cộng đồng mắc phải: được định nghĩa là nhiễm trùng bên ngoài bệnh viện, cơ sở chăm sóc dài hạn hoặc viện dưỡng lão [182].

1.2. Gánh nặng bệnh tật của vi khuẩn kháng kháng sinh và thực trạng kháng kháng sinh của một số vi khuẩn đáng quan tâm trên thế giới

1.2.1. Gánh nặng bệnh tật do kháng kháng sinh

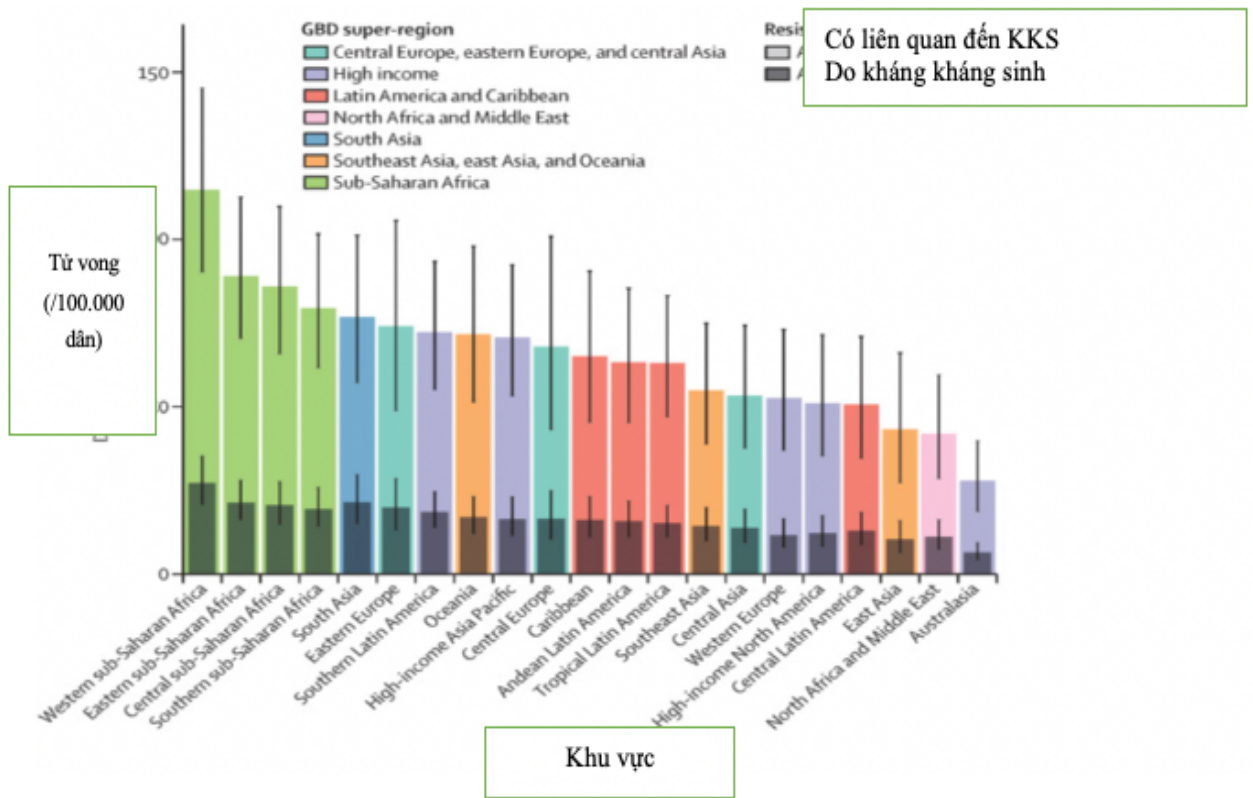
Tình trạng kháng thuốc của vi khuẩn xảy ra khi những thay đổi trong vi khuẩn khiến các loại thuốc được sử dụng để điều trị nhiễm trùng trở nên kém hiệu quả hơn. Kháng kháng sinh đã nổi lên như một trong những mối đe dọa sức khỏe

cộng đồng hàng đầu của thế kỷ 21. Chính phủ Anh cho rằng kháng kháng sinh có thể giết chết 10 triệu người mỗi năm vào năm 2050 [202]. TCYTTG và nhiều nhóm và nhà nghiên cứu khác cung cấp bằng chứng cho rằng sự lây lan của kháng kháng sinh là một vấn đề cấp bách đòi hỏi phải có một kế hoạch hợp tác hành động, toàn cầu để giải quyết [91, 224, 284]. Thông tin về mức độ hiện tại gánh nặng của vi khuẩn kháng kháng sinh, xu hướng ở các khu vực khác nhau trên thế giới, các tác nhân kháng kháng sinh cao nhất là rất quan trọng. Nếu không được kiểm soát, sự lây lan của vi khuẩn kháng kháng sinh có thể gây chết người trong tương lai cao hơn nhiều so với hiện nay.

Hiểu được gánh nặng thực sự của việc kháng thuốc là một thách thức lớn hiện nay do nhiều nơi hạn chế về mặt dữ liệu. Tuy nhiên các nhà khoa học cũng đã cố gắng phân tích và ước lượng về số liệu gánh nặng do vi khuẩn kháng kháng sinh gây ra. Tại Hoa Kỳ, ước tính tỷ lệ tử vong do vi khuẩn kháng kháng sinh là 6,5%, [233] khoảng 23.000 ca tử vong mỗi năm [74]. Ước tính ở Liên minh Châu Âu số ca tử vong do vi khuẩn do một số kháng kháng sinh được lựa chọn là khoảng 25.000 người mỗi năm [74]. Có rất ít thông tin về tỷ lệ tử vong do vi khuẩn kháng thuốc ở các quốc gia đang phát triển. Tỷ lệ tử vong do viêm phổi liên quan đến máy thở ở các ICU ở Colombia, Peru và Argentina được ước tính lần lượt là 17%, 25% và 35%, và có liên quan đến vi khuẩn kháng kháng sinh [93, 187, 234]. Tỷ lệ tử vong do tụ cầu vàng kháng kháng sinh phổ rộng và kháng methicillin (MRSA) được ước tính là 27% và 34% ở trẻ sơ sinh nhiễm trùng huyết ở Tanzania[141], ước tính rằng 58.319 trường hợp tử vong có thể là do ESBL và MRSA chỉ riêng ở Ấn Độ [156].

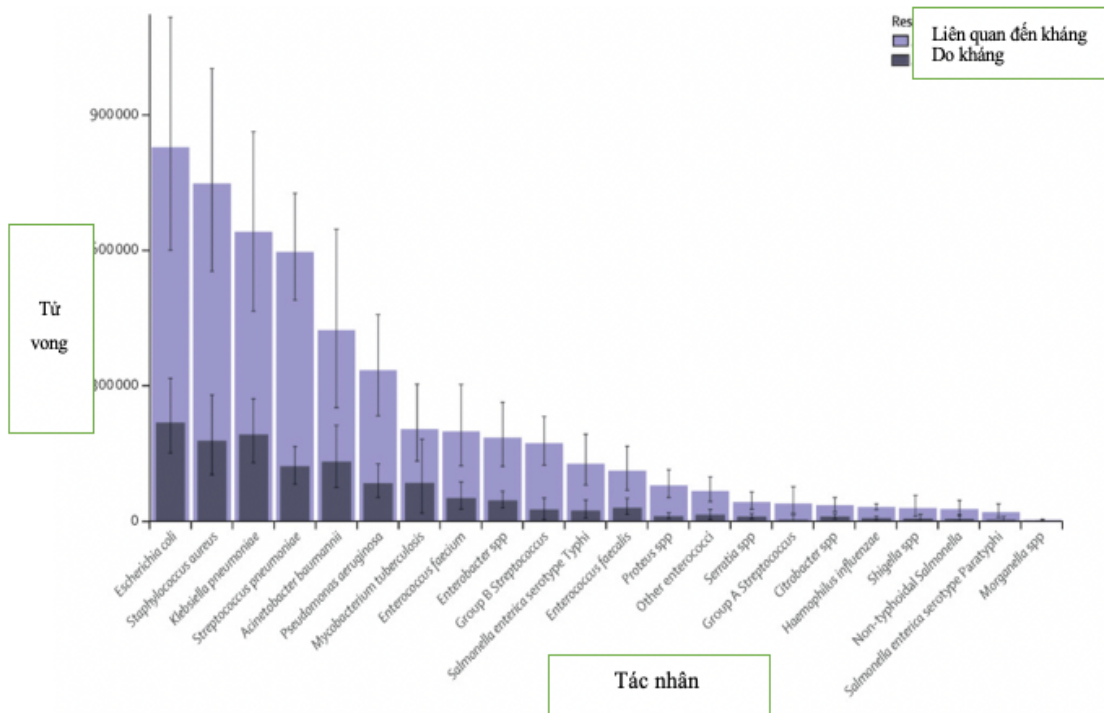
Một nghiên cứu mới nhất được đăng tải trên tạp chí Lancet đã ước tính và dự báo số liệu tử vong do vi khuẩn kháng kháng sinh gây ra và tử vong liên quan đến vi khuẩn kháng kháng sinh. Số liệu ước tính vào năm 2019, trên toàn cầu có 1,27 triệu ca tử vong do vi khuẩn kháng thuốc và 4,95 triệu ca tử vong có liên quan đến vi khuẩn kháng kháng sinh [191].

Trong đó, Châu Úc có gánh nặng do vi khuẩn kháng kháng sinh thấp nhất vào năm 2019, với 6,5/100.000 tử vong do vi khuẩn kháng kháng sinh và 28/100.000 tử vong liên quan đến vi khuẩn kháng kháng sinh. Châu Phi cận Sahara có gánh nặng cao nhất, với 27,3/100.000 tử vong do kháng kháng sinh và 114,8/ 100.000 trường hợp tử vong liên quan đến vi khuẩn kháng kháng sinh[191].



Hình 1.3: Tử vong do vi khuẩn kháng kháng sinh và liên quan đến vi khuẩn kháng kháng sinh theo khu vực [191]

Ba triệu chứng truyền nhiễm có gánh nặng toàn cầu cao do và liên quan đến kháng kháng sinh trong năm 2019 bao gồm nhiễm trùng đường hô hấp dưới và lòng ngực, nhiễm trùng máu và nhiễm trùng trong ổ bụng. Ba triệu chứng này chiếm 78,8% số ca tử vong do kháng kháng sinh trong năm 2019; Chỉ riêng nhiễm trùng đường hô hấp dưới đã chiếm hơn 400 000 ca tử vong do vi khuẩn kháng kháng sinh và 1,5 triệu ca tử vong liên quan đến vi khuẩn kháng kháng sinh[191].



Hình 1.4: Tỷ vong toàn cầu do và liên quan đến vi khuẩn kháng kháng sinh theo tác nhân, 2019 [191]

Năm 2019, sáu tác nhân gây bệnh có ca tử vong cao nhất (Biểu đồ 1.4) bao gồm: *E.coli*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *S.pneumoniae*, *A.baumannii* và *Pseudomonas aeruginosa*, theo thứ tự số ca tử vong. Tổng sáu tác nhân này đã gây ra 929 000 (trong số 1,27 triệu ca tử vong do vi khuẩn kháng kháng sinh và 3,57 triệu trong số 4,95 triệu ca tử vong liên quan đến vi khuẩn kháng kháng sinh trên toàn cầu vào năm 2019. Đối với các ca tử vong do kháng kháng sinh, *E.coli* là nguyên nhân gây ra nhiều ca tử vong nhất trong năm 2019, tiếp theo là *K.pneumoniae*, *S.aureus*, *A.baumannii*, *S.pneumoniae* và *M. tuberculosis*[191].

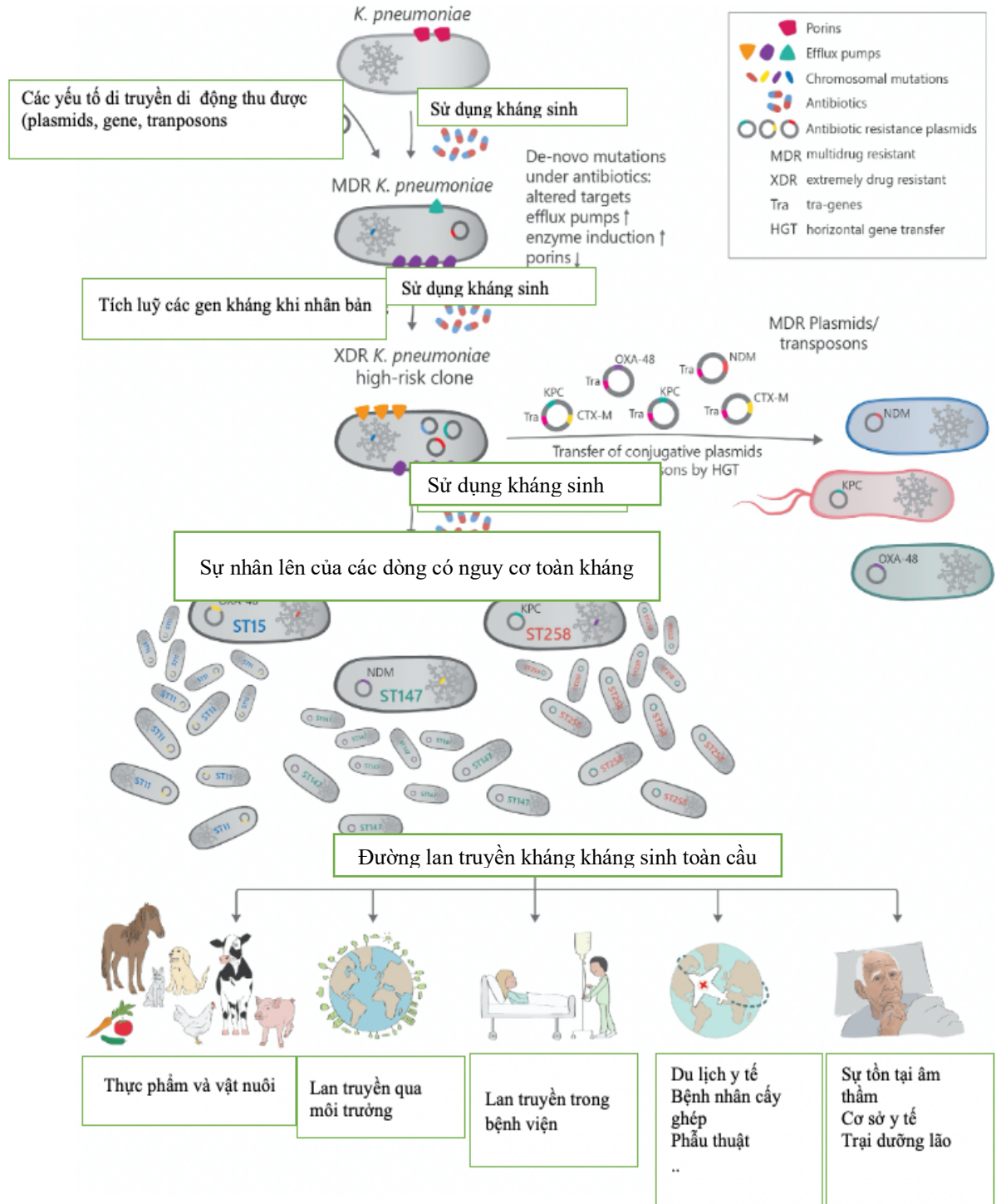
Theo báo cáo mới năm 2021 của TCYTTG, trong Hệ thống Giám sát kháng kháng sinh toàn cầu với số liệu của 68 quốc gia, *E.coli* và *K.pneumoniae* là 2 trong 3 tác nhân kháng kháng sinh phổ biến nhất, đặc biệt đây là 2 tác nhân có tỷ lệ đa kháng và nhiễm trùng huyết rất cao ở cả bệnh viện và cộng đồng. *E. coli* (97%), *K. pneumoniae* (94%) có mặt ở nhiễm trùng máu, nhiễm trùng tiêu hoá và tiết niệu. Số liệu này bao gồm cả ở cộng đồng và bệnh viện [210]. Do đó, nghiên cứu xem xét tổng quan hai tác nhân này để thấy tình trạng kháng kháng sinh của các tác nhân này trên phạm vi toàn cầu.

Bên cạnh gánh nặng bệnh tật, gánh nặng về kinh tế cũng được phân tích tới. Một nghiên cứu tổng quát chỉ ra rằng 48% các nghiên cứu ước tính gánh nặng tử

vong cho thấy tác động đáng kể từ sức đề kháng, chi phí hệ thống chăm sóc sức khỏe có thể lên tới 1 tỷ đô la mỗi năm, trong khi gánh nặng kinh tế dao động từ 21.832 đô la mỗi trường hợp đến hơn 3 nghìn tỷ đô la trong tổn thất thu nhập quốc nội [196].

1.2.2. Thực trạng vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* kháng thuốc

Vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) thường được phân lập ở ruột của người, đặc biệt với những người có tiền sử nhập viện. Đa số những nhiễm trùng do *K.pneumoniae* có liên quan đến chăm sóc y tế. Những nhiễm trùng này bao gồm nhiễm trùng tiết niệu, viêm đường hô hấp dưới và nhiễm trùng máu. Kháng kháng sinh ở *K. pneumoniae* phát triển thông qua tích hợp, như kháng fluoroquinolone hay bằng thu nhận các yếu tố gen di động của *K.pneumoniae* mang gen kháng. Tỷ lệ kháng cao với các kháng sinh phổ rộng ở các loài này. Kháng kháng sinh ở *K.pneumoniae* phát triển thông qua đột biến, như đối với kháng fluoroquinolone, hoặc bằng cách thu nhận các yếu tố di truyền. *K.pneumoniae* mang một gen kháng thuốc (nhiễm sắc thể định vị beta-lactamase) có khả năng tái tạo một cách tự nhiên các penicillin với phổ vô hiệu kéo dài. Kháng với các loại kháng sinh đường uống được sử dụng rộng rãi và có sẵn khác như co-trimoxazole và fluoroquinolones đã xuất hiện và lan rộng trên toàn cầu [244]. Tỷ lệ kháng kháng sinh của *K.pneumoniae* ước lượng toàn cầu năm 2015 là 23.4% và được dự báo lên tới 50% vào năm 2030 [43].



Hình 1.5. Dấu hiệu nhận biết sự xuất hiện và lây lan của *K. pneumoniae* đa kháng và toàn kháng và các gen kháng thuốc [69]

1.2.2.1 Các gen và mức độ kháng của vi khuẩn *K.pneumoniae*

Tỷ lệ kháng cao với cephalosporin ở các loài này (qua trung gian ESBLs hoặc enzyme AmpC thu được) cũng có nghĩa là điều trị cho các nhiễm trùng đã

được khẳng định hoặc nghi ngờ trong nhiều tình huống rất phụ thuộc vào carbapenems, nếu thuốc này có sẵn tại cơ sở điều trị. *K.pneumoniae* ngày nay đã kháng rất nhiều với carbapenems trên toàn thế giới. Tất cả các gen quan trọng nhất có thể gây kháng carbapenem đã được phát hiện trong các chủng của *K. pneumoniae*, do đó hầu hết các lựa chọn điều trị hiện tại có hiệu quả kém. Các gen kháng được báo cáo rộng rãi trên toàn thế giới bao gồm SHV, TEM, CTX-M, KPC, NDM và OXA-48 [69].

Sự đề kháng với penicillin ở *K. pneumoniae* đã được báo cáo vào đầu những năm 1960, dẫn đến việc xác định các gen β -lactamase đầu tiên, *blaSHV-1* và *blaTEM-1*. Hai thập kỷ sau, gen β -lactamase phổ mở rộng (ESBLs) đầu tiên, *blaSHV-2*, được xác định ở *K. pneumoniae* được phục hồi từ một người bệnh ICU ở Đức [147]. Gen thể hiện hoạt tính phổ mở rộng chống lại các β -lactam, bao gồm cephalosporin thế hệ thứ ba và monobactam, và được xác định là gen ESBLs đầu tiên. Ngay sau đó, một biến thể ESBLs qua trung gian plasmid khác là *blaTEM-3* đã được báo cáo từ mầm bệnh này ở Pháp [250].

Kể từ khi xuất hiện ESBLs ở *K. pneumoniae*, trong những năm 1990–2000, tác nhân này đã trở thành mầm bệnh mang ESBLs chính liên quan đến các vụ bùng phát bệnh viện. Tại Israel và Tây Ban Nha, tỷ lệ 40% sinh ESBLs trong tổng số các chủng *K. pneumoniae* được phân lập tại bệnh viện đã được báo cáo [71, 194]. Trong thời kỳ đó, các chủng *K. pneumoniae* chủ yếu chứa β -lactamase TEM và SHV [84], với sự xuất hiện và lây lan của các alen khác nhau ở nhiều quốc gia. Vào những năm 2000, có sự thay đổi về loại ESBLs có trong *K. pneumoniae*, gây ra các đợt bùng phát bệnh viện, do thu nhận plasmid và transposon mã hóa ESBLs *blaCTX-M*, dẫn đến sự thống trị của các chủng mang CTX-M [68].

Các nhóm gen ESBLs đã được truyền sang *K. pneumoniae* bằng cách chuyển gen ngang (HGT) bao gồm *blaOXA* [103], và các gen hiếm *blaGES* và *blaSFO* [63], hoặc *blaPER*, *blaTLA* và *blaVEB* [220]. Hơn nữa, các gen β -lactamase kháng chất ức chế đã xuất hiện, mã hóa các enzym bị ức chế một phần bởi axit clavulanic và tazobactam [67].

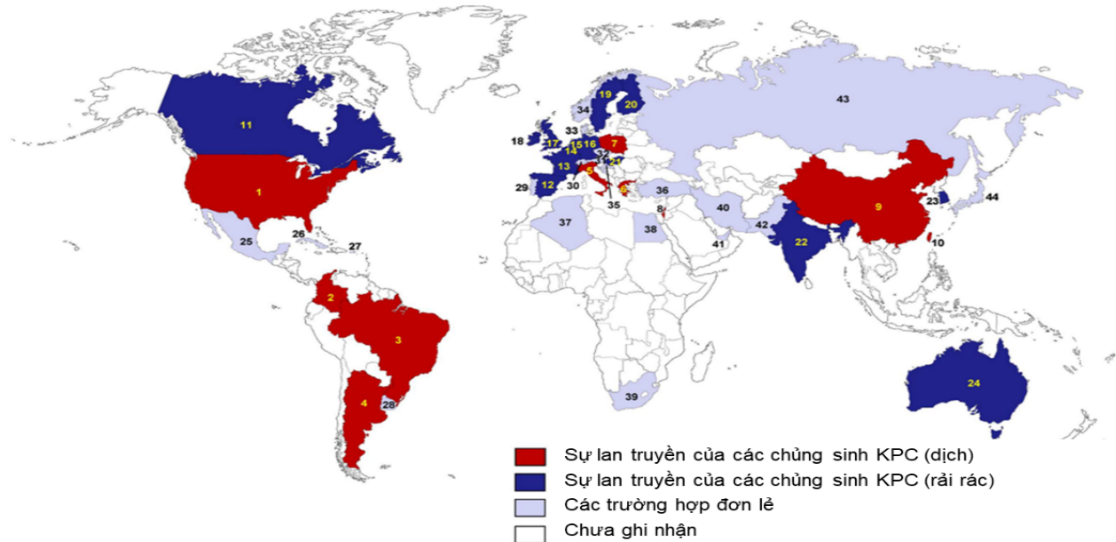
Sau 30 năm kể từ khi xuất hiện, *K. pneumoniae* sinh ESBLs đang gia tăng trên toàn thế giới, gây dịch ở nhiều quốc gia [68], mặc dù tỷ lệ hiện mắc và hàm lượng gen mã hoá sinh ESBLs khác nhau giữa các vùng địa lý khác nhau. Theo TCYTTG, sự xuất hiện của *K. pneumoniae* sinh ESBLs hiện đã đạt tỷ lệ lưu hành

lên tới 50% ở nhiều nơi trên thế giới, và tỷ lệ kháng thuốc trong cộng đồng lên tới 30% chứng tỏ tính chất phổ biến của sự kháng thuốc này [207].

Sự xuất hiện dịch lưu hành của *K. pneumoniae* sinh ESBLs ở các khu vực khác nhau trên thế giới được phản ánh bởi sự tiến hóa liên tục theo cấp số nhân của các loại và alen ESBLs mới trong loài này, cũng như trong các *Enterobacteriaceae* khác, thu được bằng cách chuyển ngang các plasmid mã hóa ESBLs và các transposon. Đặc điểm kiểu hình đa kháng của các chủng *K. pneumoniae* sinh ESBLs này đã dẫn đến sự gia tăng đáng kể trong việc sử dụng carbapenem, đây là loại thuốc kháng sinh cuối cùng để điều trị *K. pneumoniae* sinh ESBLs [168]. Việc sử dụng rộng rãi các kháng sinh dòng carbapenem đã dẫn đến sự phát triển của các carbapenemase qua trung gian plasmid, tức là các enzym thủy phân tất cả các β -lactam bao gồm cả các carbapenem dòng cuối cùng [226]. Sự xuất hiện của chúng trong họ *Enterobacteriaceae* dẫn đến *Enterobacteriaceae* kháng carbapenem (CREs). Có thể là do liên quan đến các bệnh viện, *Klebsiella* spp. là vi khuẩn kháng CRE chủ yếu và lan rộng ra toàn thế giới, gây ra mối đe dọa sức khỏe cộng đồng đáng kể [82].

Imipenem là kháng sinh carbapenem đầu tiên được sử dụng để điều trị nhiễm trùng *K. pneumoniae* vào năm 1983 [57] và các chủng kháng imipenem đã được công nhận sau 2 năm [148]. Carbapenemase được phát hiện sớm nhất là IMP-1 metallo-enzyme, được phát hiện ở *K. pneumoniae* từ năm 1991 tại Nhật Bản [121]. Vài năm sau, vào năm 1996, *K. pneumoniae* mang gen mã hoá sinh carbapenemase đầu tiên, tên là KPC, đã xuất hiện ở Hoa Kỳ [293]. Mặc dù các gen mã hoá sinh carbapenemase khác xuất hiện ở *K. pneumoniae* và thậm chí lần đầu tiên được báo cáo ở loài này, chẳng hạn như blaOXA-48 và blaNDM-1 [294], tuy nhiên blaKPC trở thành carbapenemase phổ biến nhất và có tác động mạnh đối với *K. pneumoniae*. Các chủng mang blaKPC đã được mô tả ở tất cả các châu lục, trong đó blaKPC-2 và blaKPC-3 là các gen phổ biến nhất, rất phổ biến trong các chủng liên quan đến bùng phát bệnh viện ở nhiều quốc gia [177]. Tỷ lệ mắc chung trong các chủng *Klebsiella* spp. kháng với carbapenem phân lập được từ các nhiễm trùng bệnh viện khoảng 12% từ năm 2009-2010. Chúng thủy phân một cách hiệu quả các penicillin, tất cả các cephalosporin, monobactam, carbapenem và thậm chí các chất ức chế beta-lactamase. Kể từ mô tả đầu tiên của chúng, enzyme KPC đã lan rộng khắp các quốc gia và lục địa từ các nước khác của châu Mỹ như Isarea, Canada, Brazil, Colombia; nhiều nước châu Âu (Anh, Pháp, Ba

Lan, Hy Lạp...) và một số nước châu Á như Ấn Độ, Trung Quốc (**Hình 1.6**) mặc dù dịch tễ học chúng ta chưa biết được chính xác về sự mở rộng của chúng vị trí [158, 190].



Hình 1.6. Phân bố các chủng sinh enzyme KPC trên thế giới [157].

Chú giải: Màu đỏ: các quốc gia ghi nhận vụ dịch do các chủng sinh enzyme KPC gây ra. Màu xanh: các quốc gia có sự lan truyền rải rác các trường hợp sinh KPC. Màu ghi: các quốc gia đã ghi nhận trường hợp sinh enzyme KPC (đơn lẻ). Màu trắng: các quốc gia chưa ghi nhận trường hợp nào.

Ở các quốc gia châu Âu, các chủng CRE mang gen KPC không chỉ lan rộng về mặt địa lý mà tỉ lệ lưu hành cũng không ngừng tăng lên theo các năm [157]. Tỉ lệ các chủng *K. pneumoniae* sinh KPC được phân lập tại một bệnh viện của Hy Lạp đã tăng từ 0% vào năm 2003 lên 38,3% vào năm 2010 [296]. Một nghiên cứu thu thập mẫu tại một trung tâm của Italia đã công bố 432 trường hợp mang gen KPC trên tổng số 436 chủng *K. pneumoniae* kháng carbapenem được thu thập từ 2012 -2014 [213].

Một nghiên cứu tổng hợp được công bố năm 2017 đã phân tích 13 vụ dịch xảy ra ở Châu Mỹ và Châu Âu. Tất cả các vụ dịch đều xảy ra ở các cơ sở y tế. Số lượng người bệnh tham gia phân tích tại nghiên cứu này là trên 3500 và 766 chủng dương tính với KPC, các chủng KPC chủ yếu là KPC-1, KPC-2 và KPC-3. Tỷ lệ mắc của người bệnh ở các nghiên cứu có sự dao động $52\% \pm 20,8\%$ [69]. Điều đáng quan tâm hơn, tỷ lệ tử vong do *K.pneumoniae* mang gen KPC trong các nghiên cứu là khá cao.

Tại nghiên cứu phân tích 13 vụ dịch, có 4 nghiên cứu báo cáo tỷ lệ tử vong lần lượt là 27,8%, 37,5% (3/8 người bệnh tử vong), 66,7% (4/6 người bệnh tử vong) và 33,3% (6/18 người bệnh tử vong). Một nghiên cứu bệnh chứng tại 1 bệnh viện lớn (1000 giường) tại Israel cho thấy tỷ lệ tử vong do *K.pneumoniae* do KPC là 50%. Một nghiên cứu khác tại Hy Lạp chỉ ra tỷ lệ này cao hơn ở người bệnh *K.pneumoniae* mang gen KPC (37%) so với các người bệnh nhiễm trùng do *K.pneumoniae* không kháng [69].

Tại khu vực Châu Á – Thái Bình Dương, dịch cũng đã được ghi nhận ở Trung Quốc, Đài Loan và các báo cáo đơn lẻ về các chủng sinh KPC rải rác ở nhiều quốc gia như Ấn Độ, Hàn Quốc và Úc [157]. Ở Trung Quốc tỉ lệ các chủng mang gen KPC đã lên tới 63% trong tổng số các chủng vi khuẩn kháng carbapenem được thu thập từ 13 bệnh viện từ 2008 – 2011, trong đó chủ yếu là KPC-2 [162]. Trong số các sequence type (ST) đang lưu hành thì các ST phổ biến nhất bao gồm ST 258 (*K. pneumoniae*) [157]. Ở khu vực châu Á, ST11, rất gần với ST258, đang thịnh hành đặc biệt là ở Trung Quốc và Đài Loan [262, 291]. Tại Hàn Quốc tỷ lệ kháng của *K.pneumoniae* với các kháng sinh cefotaxime, cefepime, and carbapenem lần lượt là 38–41%, 33–41%, và <0,1–2% từ năm 2013-2015 [142]. Tại Việt Nam, năm 2012 and 2013 tỷ lệ *K.pneumoniae* kháng carbapenem là 14,9%, theo kết quả khảo sát tại Khoa hồi sức cấp cứu của 16 bệnh viện. Một nghiên cứu tại Phòng hồi sức cấp cứu của 3 bệnh viện Nhi trên tổng số 1363 ca bệnh, nhiễm trùng bệnh viện được xác định trên 1/3 số ca này và hầu hết do *K.pneumoniae*, trong đó kháng với carbapenem lên tới 55% [95] .

1.2.2.2 *K.pneumoniae* kháng thuốc ở các nhiễm khuẩn cộng đồng

Các chương trình giám sát và nghiên cứu về kháng thuốc trong cộng đồng chưa được là các nghiên cứu ưu tiên do đó số liệu *Klebsiella* spp. kháng thuốc cộng đồng còn nghèo nàn. Các quốc gia có nguồn lực, tỷ lệ các bệnh truyền nhiễm ở cộng đồng thấp và việc kiểm soát sử dụng kháng sinh tại cộng đồng và trong chăn nuôi tốt, trong khi các nước nghèo thiếu nguồn lực nghiên cứu thì vấn đề kháng kháng sinh tại cộng đồng lại là vấn đề trầm trọng do việc sử dụng kháng sinh trong cộng đồng không được kiểm soát.

K.pneumoniae, đã được chứng minh là các mầm bệnh Gram âm chủ yếu trong các bệnh nhiễm trùng máu khởi phát tại cộng đồng. *K. pneumoniae* sinh ESBsL (ESBLs-KP) thường nghiêm trọng và có liên quan đến tăng tỷ lệ thất bại trong điều trị, tỷ lệ tử vong cao và chi phí nhập viện cao và đã làm dấy lên những

lo ngại về sức khỏe cộng đồng và đang dần trở thành một thách thức lâm sàng. Trong những năm gần đây, một số nghiên cứu đã báo cáo về tỷ lệ vi khuẩn dương tính với ESBLs trong nhiễm trùng máu khởi phát ở cộng đồng ở Trung Quốc, 16,5% (46/279) trong các phân lập *K. pneumoniae*, CTX-M-14 là kiểu gen ESBLs phổ biến nhất và phổ biến khắp cả nước. Tỷ lệ lưu hành ESBLs-Kp khác nhau ở các khu vực địa lý khác nhau của Trung Quốc (10,2–50,3%). Ba gen ESBLs phổ biến nhất là blaCTX-M-14 (n = 74), blaCTX-M-15 (n = 60) và blaCTX-M-3 (n = 40) [225]. Một nghiên cứu tại Thổ Nhĩ Kỳ trên người nhiễm khuẩn tiết niệu khởi phát cộng đồng cho thấy 47% *Klebsiella* spp. sinh ESBLs. Kết quả tương tự cũng được tìm thấy trong các nghiên cứu khác ở Thổ Nhĩ Kỳ. Những điều này chỉ ra rằng *Klebsiella* spp. không chỉ là một vấn đề bệnh viện, mà còn là một vấn đề toàn diện ngày càng tăng trong nhiễm trùng tiết niệu tại cộng đồng [149].

Một nghiên cứu theo dõi 3 năm từ 2015-2018 trên những mẫu máu, mủ, phân, đờm, trực tràng của các người bệnh nhiễm khuẩn ở cộng đồng của Ấn Độ cho thấy tỷ lệ *K. pneumoniae* sinh ESBLs tăng nhanh trong 3 năm và lần lượt là 21,8%; 35,5% và 45,7%. Các gen được tìm thấy chủ yếu là CTX-M. Tuy nhiên một điểm quan trọng là có sự xuất hiện của các gen kháng carbapenem tại những mẫu này, và tỷ lệ cũng tăng theo năm lần lượt là 8,4%; 11,5% và 16,6%. Hai gen được phát hiện là MBL và NDM-1 [97].

Một nghiên cứu khác được thực hiện trong thời gian 1 năm (từ tháng 1 đến tháng 12 năm 2015) đã báo cáo tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *E. coli* và *K. pneumoniae* sinh mang gen mã hoá sinh carbapenemase thấp hơn, tức là 7,8% [29] so với các nghiên cứu từ vùng nông thôn miền Nam Ấn Độ 19,4% –22,1% [242]. Trong nghiên cứu này, tất cả gen mã hoá sinh carbapenemase đều là blaNDM-1, trong khi các nghiên cứu được thực hiện ở các thành phố, cụ thể là Delhi và Aligarh, Uttar Pradesh, Ấn Độ, đã báo cáo các biến thể khác của blaNDM là blaNDM-4, blaNDM-5, blaNDM-7 và blaNDM-8 [34]. Hầu như không có bất kỳ báo cáo nào về blaNDM -1 phát hiện ở người bệnh nhiễm khuẩn cộng đồng nông thôn từ Ấn Độ. Một nghiên cứu khác thực hiện trước đó vào năm 2015 đã báo cáo tỷ lệ lưu hành bệnh blaNDM-1 là 1,7% trong số các chủng *E. coli* và *K. pneumoniae* phân lập từ người bệnh nhiễm khuẩn cộng đồng [29].

Trong những nghiên cứu này, các chủng *E. coli* và *K. pneumoniae* sinh ESBLs phân lập từ người bệnh nhiễm khuẩn khởi phát cộng đồng cho thấy mức độ kháng đa thuốc cao đối với một số loại kháng sinh thường được sử dụng, cụ

thể là ampicillin, amoxycylavic, cephalosporin, co-trimoxazole, fluoroquinolones và acid nalidixic. Trong khi mức độ đề kháng trung gian đã được ghi nhận đối với cefoxitin, chloramphenicol và nitrofurantoin. Một nghiên cứu từ Nam Ấn Độ cũng báo cáo mức độ đề kháng cao hơn từ 55,6% đến 98,5% đối với ampicillin, cephalosporin, ciprofloxacin và co-trimoxazole từ *E. coli* và *K. pneumoniae* sinh ESBLs phân lập từ người bệnh nhiễm khuẩn khởi phát cộng đồng [97].

Sự lây lan đáng lo ngại này của các *K.pneumoniae* sinh ESBLs và NDM-1 trong cộng đồng cần được quan tâm để thúc đẩy giám sát kháng kháng sinh thường xuyên, để theo dõi những thay đổi trong mô hình kháng. Ngoài ra, dữ liệu được tạo ra về người bệnh nhiễm khuẩn cộng đồng được kỳ vọng sẽ bổ sung cho dữ liệu về người bệnh nhập viện từ cộng đồng, giúp đánh giá mức độ thực sự của kháng kháng sinh ở các quốc gia.

1.2.3. Thực trạng *Escherichia coli* kháng kháng sinh

Escherichia coli (*E.coli*) là một loại vi khuẩn nằm trong hệ đường ruột ở người và động vật. Tuy nhiên, đây cũng là nguyên nhân thường gặp nhất của nhiễm trùng đường tiết niệu cộng đồng và bệnh viện (bao gồm nhiễm trùng thận), nguyên nhân thường gặp nhất của nhiễm trùng máu ở mọi lứa tuổi, nó có liên quan đến nhiễm trùng trong ổ bụng như viêm phúc mạc và với nhiễm trùng da và mô mềm do nhiều vi sinh vật, và nó là một nguyên nhân gây viêm màng não ở trẻ sơ sinh. *E.coli* cũng là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây các bệnh nhiễm trùng do thực phẩm trên toàn thế giới. Nhiều bệnh nhiễm trùng do *E. coli* bắt nguồn từ ruột của người bị nhiễm trùng (nhiễm trùng tự nhiên), nhưng các chủng có một số đặc tính gây bệnh (đặc biệt là các bệnh gây bệnh đường ruột) hoặc cũng có thể lây truyền từ động vật, thông qua chuỗi thức ăn, giữa người và người.

Kháng kháng sinh ở *E.coli* phát triển thông qua đột biến, như đối với kháng fluoroquinolone, hoặc bằng cách thu nhận các yếu tố di truyền, như đối với penicillin và kháng cephalosporin thế hệ thứ ba. Sự đề kháng với cephalosporin thế hệ thứ ba chủ yếu được tạo ra bởi các enzyme được gọi là beta-lactamase phổ mở rộng (ESBLs) và các chủng *E. coli* có ESBLs thường kháng với một số nhóm thuốc kháng khuẩn khác. Ngoài ra, vì quinolone có lẽ là một trong những nhóm thuốc kháng khuẩn được sử dụng rộng rãi nhất để điều trị nhiễm trùng đường tiết niệu, trong đó *E. coli* là nguyên nhân phổ biến nhất, kháng với nhóm này có thể là dấu hiệu kháng thuốc của một trong những thuốc cuối cùng tùy chọn điều trị bằng miệng có sẵn, đặc biệt là trong các khu vực thu nhập thấp.

Carbapenem thường vẫn là lựa chọn điều trị duy nhất cho các trường hợp nhiễm trùng nặng, mặc dù tình trạng kháng carbapenem ở *E. coli* là một mối đe dọa mới nổi và do một loạt các carbapenemase, có thể gây kháng với hầu như tất cả các loại thuốc kháng khuẩn beta-lactam có sẵn.

Colistin được sử dụng với tần suất ngày càng tăng, ở nơi sẵn có, đối với các bệnh nhiễm trùng Gram âm toàn kháng, và kháng colistin mắc phải vẫn còn hiếm ở hầu hết các quốc gia có khả năng theo dõi nó. Tuy nhiên, mối quan tâm đặc biệt là sự kháng thuốc qua trung gian plasmid với colistin (qua gen MCR), được mô tả đầu tiên ở *E. coli* phân lập từ động vật thực phẩm ở Trung Quốc và sau đó được tìm thấy ở các người bệnh phân lập lâm sàng ở các người bệnh khác nhau trên thế giới.

Các chủng vi khuẩn đường ruột (họ vi khuẩn bao gồm cả *E.coli*) kháng với KS cephalosporin thế hệ 3 được TCYTTG xếp vào danh mục ưu tiên rất cao cho việc nghiên cứu và phát triển các kháng sinh điều trị mới và hiệu quả [283].

1.2.3.1 Sự lưu hành của *E. coli* sinh ESBLs trong bệnh viện

Dịch tễ học của ESBLs khá phức tạp. Thứ nhất về mặt không gian và vật chủ cần cân nhắc đến khu vực địa lý, quốc gia, bệnh viện, cộng đồng, người bệnh và người lành mang bệnh. Thứ hai, đây là những vi khuẩn và các yếu tố di truyền của chúng là di động, thường là plasmid. Ngoài ra, có nhiều các ổ chứa khác nhau, bao gồm môi trường (ví dụ đất và nước), động vật hoang dã, động vật nông trại và vật nuôi. Và cuối cùng là sự truyền qua thực phẩm, nước, và qua tiếp xúc trực tiếp hoặc gián tiếp (người với người). Vi khuẩn sinh ESBLs đầu tiên được phát hiện ở Châu Âu năm 1983 nơi các KS β -lactam phổ rộng được sử dụng đầu tiên trên lâm sàng, đặc biệt ở Đức và Pháp. Sau đó không lâu ESBLs đã được phát hiện ở Mỹ và Châu Á và hiện nay nó đã có mặt trên toàn cầu và là vấn đề nghiêm trọng của y tế. Mức độ xuất hiện vi khuẩn sinh ESBLs khác nhau ở từng quốc gia cũng như ở các cơ sở y tế của mỗi nước. Theo Chương trình giám sát xu hướng đề kháng kháng sinh trên toàn thế giới (SMART) trong 10 năm từ 2002-2011 ở 179 bệnh viện trên thế giới cho thấy: *E. coli* là nguyên nhân hàng đầu trong cả nhiễm khuẩn ổ bụng (47,8%) và nhiễm khuẩn tiết niệu (44,3%). Với các vi khuẩn phân lập được từ người bệnh nhiễm trùng tiết niệu thì tỷ lệ vi khuẩn sinh ESBLs cao nhất ở khu vực châu Á và Trung Đông (từ 30% đến 50%) [188].

Tại Châu Âu: Theo báo cáo giám sát năm 2016 của Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa bệnh tật Châu Âu (ECDC), *E.coli* kháng cephalosporin thế hệ 3

được phân lập từ cơ sở y tế của 28 nước thành viên là 12,8%. Cao nhất ở bốn nước Bulgari, Cyprus, Italia và Slovakia (có tỷ lệ lần lượt là 41,6%, 30,2%, 29,8% và 29,7%). Bốn nước có tỷ lệ thấp nhất là Iceland, Na Uy, Hà Lan và Đan Mạch (lần lượt là 4,2%, 5,6%, 6,4% và 6,6%). Phần lớn các chủng này có ESBLs dương tính (88,4%), số liệu này năm 2011 là 85%. Đặc biệt các vi khuẩn này không chỉ kháng đối với cephalosporin thế hệ 3 mà còn kháng với nhiều kháng sinh khác như với aminoglycosid, fluoroquinolon. Nguy hiểm hơn các chủng vi khuẩn kháng với cephalosporin thế hệ 3 thường kháng ít nhất ba nhóm kháng sinh gây nên tình trạng đa kháng thuốc [42] [55].

Một nghiên cứu tại Hy Lạp, 124 chủng *E. coli* phân lập từ bệnh phẩm ở 2 bệnh viện tỷ lệ sinh ESBLs của *E. coli* là 25/124 (20,2%), trong đó SHV-5 là phổ biến nhất (63,4%), CTX-M (33,8%) và IBC (2,8%)[264]. Số liệu tại Bỉ, khi nghiên cứu trên 337 mẫu bệnh phẩm tại 1 bệnh viện, tỷ lệ *Enterobacteriaceae* sinh ESBLs không triệu chứng ở đường ruột là 11,6%, nghiên cứu cũng chỉ ra yếu tố nguy cơ của nhiễm ESBLs là có tiền sử tiếp xúc nhiều với bệnh viện và đặt catheter trong thời gian dài. Nghiên cứu trên các chủng *E. coli* và *Klebsiella* thu thập được ở 40 bệnh viện cho thấy: *E. coli* sinh ESBLs được phát hiện ở 33/40 bệnh viện. Tỷ lệ *E. coli* sinh ESBLs ở các bệnh viện dao động từ 0% đến 2,4%. Trong đó 51% các chủng *E. coli* sinh ESBLs được phân lập từ người bệnh ngoại trú. Các chủng *E. coli* sinh ESBLs chủ yếu được phân lập từ nước tiểu ở các người bệnh thuộc khoa ngoại [241].

Tại Châu Á: Châu Á ngày càng là điểm nóng của tình trạng kháng kháng sinh do dân số đông, do tình trạng nhiễm khuẩn ở cả bệnh viện và cộng đồng và mức độ và sự kiểm soát sử dụng kháng sinh ở cả người và trong chăn nuôi. Các số liệu giám sát về tình hình vi khuẩn kháng kháng sinh ở khu vực châu Á- Thái Bình Dương cho thấy *E. coli* sinh ESBLs phân bố khác nhau ở mỗi nước và tỷ lệ vi khuẩn này có xu hướng gia tăng nhanh. Một nghiên cứu năm 1998-1999 trên các chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm ở khu vực châu Á: tỷ lệ sinh ESBLs của các chủng *E. coli* ở là 5,8%. Trung Quốc là quốc gia có tỷ lệ cao nhất (từ 13,3% đến 35,1% tùy bệnh viện), tiếp đến là Đài Loan (25%), Hồng Kông (14,1%), Philipine 13%. Tỷ lệ này thấp ở các nước như Nhật Bản (5,5%), Singapore (5,1%), Úc (0,2 đến 1%) [58]. Đến năm 2007 nghiên cứu SMART, trong tổng số 3.004 chủng Gram âm được phân lập năm 2007 ở khu vực châu Á- Thái Bình Dương tỷ lệ sinh ESBL ở *E. coli* là 42,2%. Tỷ lệ này cao ở các nước

Ấn Độ (79%), Trung Quốc (55%), Thái Lan (50,8%). Các nước có tỷ lệ *E. coli* sinh ESBLs trung bình là Việt Nam (34,4%), Singapore (33,3%). Các quốc gia có tỷ lệ thấp hơn là Hàn Quốc, Hồng Kông, Philipine, Đài Loan, Úc, New Zealand. Tại những nước này có tỷ lệ *E. coli* sinh ESBLs là 3,2 - 22,7% [123]. Cũng theo nghiên cứu này từ năm 2010 đến năm 2013, trên 17.350 chủng vi khuẩn Gram âm phân lập từ người bệnh nhiễm khuẩn ổ bụng ở 54 bệnh viện thuộc 13 nước trong vùng châu Á – Thái Bình Dương cho thấy: 3 tác nhân chủ yếu *E. coli* (46,1%), *K. pneumoniae* (19,3%) và *P. aeruginosa* (9,8%). Tỷ lệ sinh ESBLs ở *E. coli* là 38,2%, cao nhất ở Trung Quốc (66,6%), Thái Lan (49,8%) và Việt Nam (47,9%). Trung Quốc, Hàn Quốc, Thái Lan và Việt Nam có tỷ lệ *E. coli* sinh ESBLs cao trên 20% trong các nhiễm khuẩn cộng đồng. Úc có tỷ lệ ESBLs thấp nhất (dưới 10%) trong cả nhiễm khuẩn bệnh viện và cộng đồng[77].

Nghiên cứu của nhóm tác giả Nakama và cs. (2016) ở 114 chủng *Enterobacteriaceae* sinh ESBLs được phân lập từ 1672 mẫu bệnh phẩm ở bệnh viện Okinawa, Nhật Bản từ tháng 6/2013 đến tháng 7/2014 cho thấy tỷ lệ *Enterobacteriaceae* sinh ESBLs là 6,8%, trong đó tỷ lệ sinh ESBLs của *E. coli* là 11,5%[193]. Ở *E. coli* sinh ESBLs chủ yếu là mang các gen CTX: *bla*CTX-M-15 (33,3%), *bla*CTX-M-14 (27,8%), và *bla*CTX-M-27 (33,3%). Một nghiên cứu được thực hiện tại bệnh viện đại học Chosun, Hàn Quốc từ tháng 9/2005 đến tháng 9/2009 cho thấy tỷ lệ các chủng sinh *E. coli* sinh ESBLs là 12,6%. Các chủng này chủ yếu mang các gen mã hóa ESBLs là CTX-M (93,5%) và SHV (12,9%)[185].

Ấn Độ: Nghiên cứu trên 221 chủng *E. coli* được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm của người bệnh nội trú và ngoại trú ở 1 bệnh viện thuộc Ấn Độ từ 2005 đến 2007 cho kết quả: 95,4% (211/221) các chủng *E. coli* sinh ESBLs, các chủng vi khuẩn ESBLs phân lập được phần lớn là từ người bệnh nội trú (71,1%), từ người bệnh ngoại trú chiếm 28,8%[53]. Một nghiên cứu khác trên các chủng *E. coli* phân lập từ bệnh phẩm từ bệnh viện ở cả người bệnh nội trú và người bệnh ngoại trú tại một bệnh viện đại học ở Ấn Độ cho thấy: Trong 1642 chủng *E. coli* phân lập được có 810 (49,33%) chủng từ nhiễm khuẩn cộng đồng (người bệnh ngoại trú) và 832 (50,66%) chủng từ nhiễm khuẩn bệnh viện. Tỷ lệ *E. coli* ESBLs ở nhóm người bệnh ngoại trú là 48,76%, nội trú là 44,35%. Nghiên cứu này cho thấy tỷ lệ sinh ESBLs của *E. coli* trong bệnh viện và từ cộng đồng là tương đương nhau [228].

Trung Quốc: Theo kết quả nghiên cứu trên 3074 chủng *E. coli* và 1025 chủng *K. pneumoniae* được phân lập từ người bệnh nhiễm khuẩn ổ bụng tại 23 bệnh viện thuộc 16 thành phố ở Trung Quốc trong 10 năm từ 2002-2011 cho thấy: Tỷ lệ ESBLs của các chủng *E. coli* phân lập từ các nhiễm khuẩn ổ bụng tăng gần gấp đôi từ 36,1% năm 2002–2003 lên đến 68,1% trong 2010–2011. Trong đó tỷ lệ ESBLs ở các nhiễm khuẩn tại bệnh viện tăng từ 52,2% năm 2002–2003 đến 70,0% năm 2010–2011, và tại các nhiễm khuẩn từ cộng đồng tăng từ 19,1% năm 2002–2003 lên đến 61,6% năm 2010–2011 [292].

Châu Mỹ: Một nghiên cứu trên 110 chủng vi khuẩn *E. coli* và *Klebsiella* được phân lập từ 94 người bệnh ở khoa hồi sức cấp cứu ở 1 bệnh viện Nhi ở Mỹ, có 53% các chủng là *E. coli*, tỷ lệ *E. coli* sinh ESBLs là 11,8% tương đương với *Klebsiella*. Hầu hết các chủng ESBLs đều được phân lập từ những người bệnh điều trị ceftazidime và/hoặc cefotaxime trong vòng 30 ngày và có thời gian nằm ở khoa hồi sức cấp cứu dài ngày [59]. Nghiên cứu tại các bệnh viện thuộc 12 vùng của Canada của Mulvey và nhóm nghiên cứu cho thấy tỷ lệ *E. coli* ESBLs (+) từ 0-1,79%. Tỷ lệ TEM là 8,7%, SHV là 64%, CTX-M là 23,3%, và 4% không xác định được typ [189]. Tại Braxin, nghiên cứu trên 3.728 chủng vi khuẩn phân lập từ các loại bệnh phẩm ở các người bệnh nhiễm khuẩn huyết, nhiễm khuẩn đường hô hấp dưới, có vết thương da, mô mềm và nhiễm khuẩn tiết niệu ở 12 bệnh viện ở Braxin từ 1997-1999 cho kết quả *E. coli* đứng hàng thứ 2 trong số các tác nhân gây bệnh và tỷ lệ sinh ESBLs của *E. coli* là 8,9% [235]. Nghiên cứu trên các chủng vi khuẩn Gram âm được thu thập từ các người bệnh nhiễm khuẩn ổ bụng từ 23 trung tâm thuộc 10 nước Mỹ Latinh cho thấy trong 1.003 chủng vi khuẩn Gram âm thì *E. coli* và *K. pneumoniae* là các tác nhân phổ biến nhất, tỷ lệ sinh ESBLs là 26,8% ở *E. coli* và 37,7% ở *K. pneumonia* [276].

Châu Phi: Ở Nam Phi giai đoạn 1998-1999, tỷ lệ *E. coli* sinh ESBLs là 5,1% (60), tuy nhiên nghiên cứu gần đây cho thấy tỷ lệ *Enterobacteriaceae* ESBLs chiếm tỷ lệ 62,3% trong số các chủng *Enterobacteriaceae* phân lập từ máu của 77 người bệnh ở 2 bệnh viện lớn ở Mali. Trong đó tỷ lệ này cao nhất ở *K. pneumoniae* (76,9%) và *E. coli* (64,5%)[58, 238]. Một nghiên cứu ở Nigeria, trong số các chủng vi khuẩn sinh ESBLs, 35% xuất phát từ cộng đồng và 65% từ bệnh viện, các chủng sinh ESBLs có tỷ lệ kháng cao với các kháng sinh tetracycline, gentamicin, pefloxacin, ceftriaxone, cefuroxime, ciprofloxacin và augmentin. Một nghiên cứu khác ở bệnh viện ở Tanzania, tỷ lệ vi khuẩn sinh ESBLs ở tất cả

vi khuẩn Gram âm là 29% trong đó cao nhất là *K.pneumoniae* (64%) và theo sau là *E.coli* 24%. Ở Madagascar, 10% người bệnh không nhập viện mang vi khuẩn sinh ESBLs và đa phần mang gen CTX-M-15 và có mối liên quan chặt chẽ giữa nghèo đói và tỷ lệ vi khuẩn mang gen mã hoá sinh ESBLs.

Từ các nghiên cứu trên cho thấy hiện nay *E. coli* sinh ESBLs đã lan rộng khắp bệnh viện ở các khu vực trên thế giới. Châu Á và Trung Đông là những khu vực có tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL lưu hành cao nhất, đặc biệt là Trung Quốc và các nước Đông Nam Á tỷ lệ vi khuẩn này rất cao và ngày càng tăng nhanh trong những năm gần đây. Ở Châu Âu, mặc dù tỷ lệ các chủng vi khuẩn kháng cephalosporin thế hệ 3 được phân lập từ các nước ở khu vực này thấp, đặc biệt là ở các nước Bắc Âu, nhưng tỷ lệ sinh ESBLs của các chủng kháng cephalosporin lại rất cao (từ 85-100%). Ở các khu vực khác có tỷ lệ *E. coli* sinh ESBLs thấp hơn nhưng các nghiên cứu đều cho thấy các vi khuẩn này ngày càng có xu hướng gia tăng. Quan trọng hơn, vi khuẩn *E. coli* sinh ESBLs là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây nên các nhiễm khuẩn: tiết niệu, nhiễm khuẩn huyết, nhiễm khuẩn ổ bụng trong bệnh viện. Các vi khuẩn này không chỉ được phân lập từ các người bệnh điều trị trong bệnh viện mà còn xuất hiện ở các người bệnh điều trị ngoại trú cũng như người lành tại cộng đồng. Hơn nữa các vi khuẩn này có khả năng kháng kháng sinh cao hơn nhiều so với các vi khuẩn không sinh ESBLs, đặc biệt là các vi khuẩn này có khả năng kháng đồng thời với nhiều loại kháng sinh tạo nên các vi khuẩn đa kháng thuốc rất nguy hiểm. Các nghiên cứu cũng cho thấy vi khuẩn này đang có xu hướng lan rộng ra cộng đồng và là mối đe dọa lớn cho sức khỏe con người.

Tại Việt Nam: Các vi khuẩn Gram âm sinh ESBLs đang được quan tâm trong những năm gần đây tuy nhiên chưa có nhiều nghiên cứu, các nghiên cứu chủ yếu phát hiện tỷ lệ dương tính ESBLs ở một số các bệnh viện được thể hiện ở Bảng 1.3.

Bảng 1.3. Tỷ lệ *E. coli* sinh ESBLs ở một số bệnh viện

Bệnh viện	Tỷ lệ <i>E. coli</i> sinh ESBL	TLTK
Bệnh viện Nhiệt Đới Trung ương (2011-2013)	45%	[95]
Bệnh viện Nhiệt Đới Trung ương (2014-2016)	44,2%	[259]
Số liệu tại 13 bệnh viện trong mạng lưới giám sát	59 %	[278]

(VINARES) 2016-2017

Bệnh viện Đa khoa An Giang	53,5%	[98]
(2020-2021)		

Nghiên cứu 204 chủng vi khuẩn Gram âm phân lập được tại bệnh viện Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh từ 7 -12/2008 cho thấy có 32,2% các chủng vi khuẩn sinh ESBLs, trong đó *E. coli* chiếm tỷ lệ cao nhất (71,2%) [111]. Một nghiên cứu tại bệnh viện Trung Ương Huế năm 2008 trên 214 trực khuẩn gram âm được phân lập tại cho thấy *E. coli* sinh ESBLs là tác nhân hay gặp nhất trong số các tác nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện và nhiễm khuẩn cộng đồng. Các vi khuẩn sinh ESBLs phân lập được nhiều nhất ở mủ (44,61%), nước tiểu 23,07%, máu và đờm (10,77%). Các vi khuẩn sinh ESBLs tập trung chủ yếu ở khoa ngoại (49,22%) và khoa hồi sức cấp cứu (23,07%) [7]. Nghiên cứu 401 chủng VK Gram âm được phân lập từ các loại bệnh phẩm khác nhau tại bệnh viện 103, Hà Nội, giai đoạn 2007-2009 cho thấy có 148 chủng vi khuẩn sinh ESBLs, trong đó vi khuẩn Gram (-) sinh ESBLs chiếm tỷ lệ cao nhất là *E. coli* (32,43%) [9]. Một nghiên cứu tại bệnh viện Đa khoa trung tâm An Giang ở các trực khuẩn Gram âm phân lập thường quy tại Bệnh viện 01-07/2012 đã cho kết quả: Nuôi cấy 148 mẫu, có 49 chủng vi khuẩn sinh ESBLs (33,1%). Trong đó *E. coli* và *Enterobacter* chiếm tỷ lệ cao (55,4% và 33,1%). Các vi khuẩn sinh ESBLs ngoài việc đề kháng với nhóm cephalosporin cũng đề kháng với các nhóm kháng sinh khác như aminoglycosides, cycline và fluoroquinolones [10].

Năm 2013, nghiên cứu trên 157 trẻ em từ trên 1 tháng tuổi đến 15 tuổi bị tiêu chảy ở khoa hồi sức tích cực, khoa truyền nhiễm bệnh viện Nhi Đồng Cần Thơ thông báo: Tỷ lệ *E. coli* phân lập từ phân tiêu chảy là 58%, tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL 78% [5]. Nghiên cứu đặc điểm kháng kháng sinh và khả năng sinh men β -lactamase của 43 chủng *E. coli* và *Klebsiella* phân lập tại bệnh viện Đa khoa Trung ương Thái Nguyên và bệnh viện Đại học Y Dược Thái Nguyên từ 4/2012-4/2013 cho thấy: 37,31% các chủng vi khuẩn nghiên cứu sinh ESBL. Trong đó tỷ lệ sinh ESBLs của các chủng *E. coli* và *Klebsiella* là 39,53 % và 33,33% [11]. Nghiên cứu tại bệnh viện Chợ Rẫy năm 2010 cho thấy: Trong số 123 chủng trực khuẩn Gram âm sinh ESBLs được phân lập từ các loại bệnh phẩm ở người bệnh có triệu chứng nhiễm khuẩn thì *E. coli* chiếm tỷ lệ cao nhất 53,7% và *E. coli* là nguyên nhân chủ yếu gây nhiễm khuẩn cộng đồng. Nghiên cứu này cũng chỉ ra trong số 174 mẫu phân của người bệnh không mắc hội chứng nhiễm khuẩn đường tiêu hóa

đến khám tại bệnh viện thì có tới 76,4% có vi khuẩn sinh ESBLs và đến 16,5% mẫu phân phân lập được 2 loại vi khuẩn sinh ESBLs. Trục khuẩn *E. coli* là tác nhân phổ biến nhất (chiếm tỷ lệ 65,8%) trong số các vi khuẩn sinh ESBLs phân lập được [12].

Các nghiên cứu trên cho thấy hiện nay *E. coli* sinh ESBLs đã lưu hành rộng khắp trên các bệnh viện trong cả nước. *E. coli* là một trong những tác nhân có tỷ lệ sinh ESBL cao nhất và ngày càng có xu hướng tăng cao. Các vi khuẩn này cũng là một trong các tác nhân gây ra các bệnh nhiễm khuẩn trong bệnh viện như nhiễm khuẩn tiết niệu, nhiễm khuẩn tiêu hóa với tỷ lệ kháng kháng sinh cao. Thậm chí một số kết quả nghiên cứu còn cho thấy tỷ lệ nhiễm *E. coli* sinh ESBLs ở người đến khám nhưng không nhiễm khuẩn về tiêu hóa thậm chí lại cao hơn tỷ lệ này ở các người bệnh có nhiễm khuẩn trong bệnh viện. Qua đó phản ánh tình trạng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL ở đường tiêu hóa không chỉ tồn tại trong bệnh viện mà nó đang lan rộng ra cộng đồng. Các vi khuẩn sinh ESBLs ở đường tiêu hóa theo phân ra ngoài, ở điều kiện nhiệt đới của nước ta, rất dễ tồn tại và sinh sôi phát triển ngoài môi trường, càng làm tăng nguy cơ nhiễm ESBLs cho cộng đồng.

1.2.3.2 Sự lưu hành của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBLs trong cộng đồng

Hiện nay vi khuẩn *E. coli* sinh ESBLs đang lan tràn khắp nơi trên thế giới, chúng là vấn đề được nhiều nhà nghiên cứu và các bác sỹ lâm sàng quan tâm. Trước đây, các tác giả chủ yếu tập trung vào nghiên cứu vi khuẩn này ở trong bệnh viện. Tuy nhiên một số nghiên cứu gần đây cho thấy vi khuẩn này đang có xu hướng lan dần ra cộng đồng. Đặc biệt là các vi khuẩn sinh *E. coli* mang gen mã hoá sinh ESBLs được phát hiện tỷ lệ cao ở trong các mẫu phân người khỏe mạnh tại cộng đồng. Mặc dù hiện nay trên thế giới chưa có nhiều báo cáo về tình hình nhiễm *E. coli* sinh ESBLs trong cộng đồng người khỏe mạnh, nhưng các kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy các vi khuẩn này đã được phân lập từ người khỏe mạnh ở người khắp các châu lục trên thế giới.

Theo nghiên cứu của tác giả Nadine Geser và cộng sự trên mẫu phân của 586 người khỏe mạnh tại Thụy Điển năm 2013 cho thấy có 5,8 % người khỏe mạnh nhiễm *E. coli* sinh ESBLs[113]. Một nghiên cứu tại Pháp, ở những người trưởng thành khỏe mạnh ở khu vực Paris cho thấy tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBLs tăng lên gấp 10 lần sau 5 năm (0,6% vào năm 2006 và 6% vào năm 2011)[200]. Tác giả Valenza G và nhóm nghiên cứu (2014) trên 3344 mẫu phân người khỏe mạnh trong cộng đồng có tiếp xúc gần với người bệnh nhiễm khuẩn tiêu hóa thuộc

7 vùng của Bavaria ở Đức cho thấy tỷ lệ *E.coli* sinh ESBLs là 6,3% trong cộng đồng.[117]

Năm 2009, nghiên cứu tại Trung Quốc cho thấy có tới 50,5% mẫu phân của những người khỏe mạnh tham gia nghiên cứu có chứa vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL [161]. Nghiên cứu trên 160 người khỏe mạnh ở vùng nông thôn Thái Lan năm 2008 cho thấy tỷ lệ những người tham gia nghiên cứu có mang vi khuẩn sinh ESBL trong mẫu phân là 61,7%, trong đó *E. coli* chiếm ưu thế với tỷ lệ 85,1% [240]. Theo một kết quả nghiên cứu trên 150 người tình nguyện khỏe mạnh tại Tunisia năm 2009-2010 cho thấy tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBLs trong đường tiêu hóa tại cộng đồng là 7,3%[236]. Như vậy từ các nghiên cứu trên cho thấy hiện tại *E. coli* mang gen mã hoá sinh ESBLs không chỉ xuất hiện ở người bệnh trong bệnh viện hay người bệnh điều trị ngoại trú mà nó có mặt cả người khỏe mạnh trong cộng đồng trên thế giới. Đây là mối đe dọa hết sức nguy hiểm cho sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới do các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBLs tồn tại trong đường tiêu hóa người khỏe mạnh là chính là nguồn tàng trữ và lây truyền các gen kháng kháng sinh trong cộng đồng.

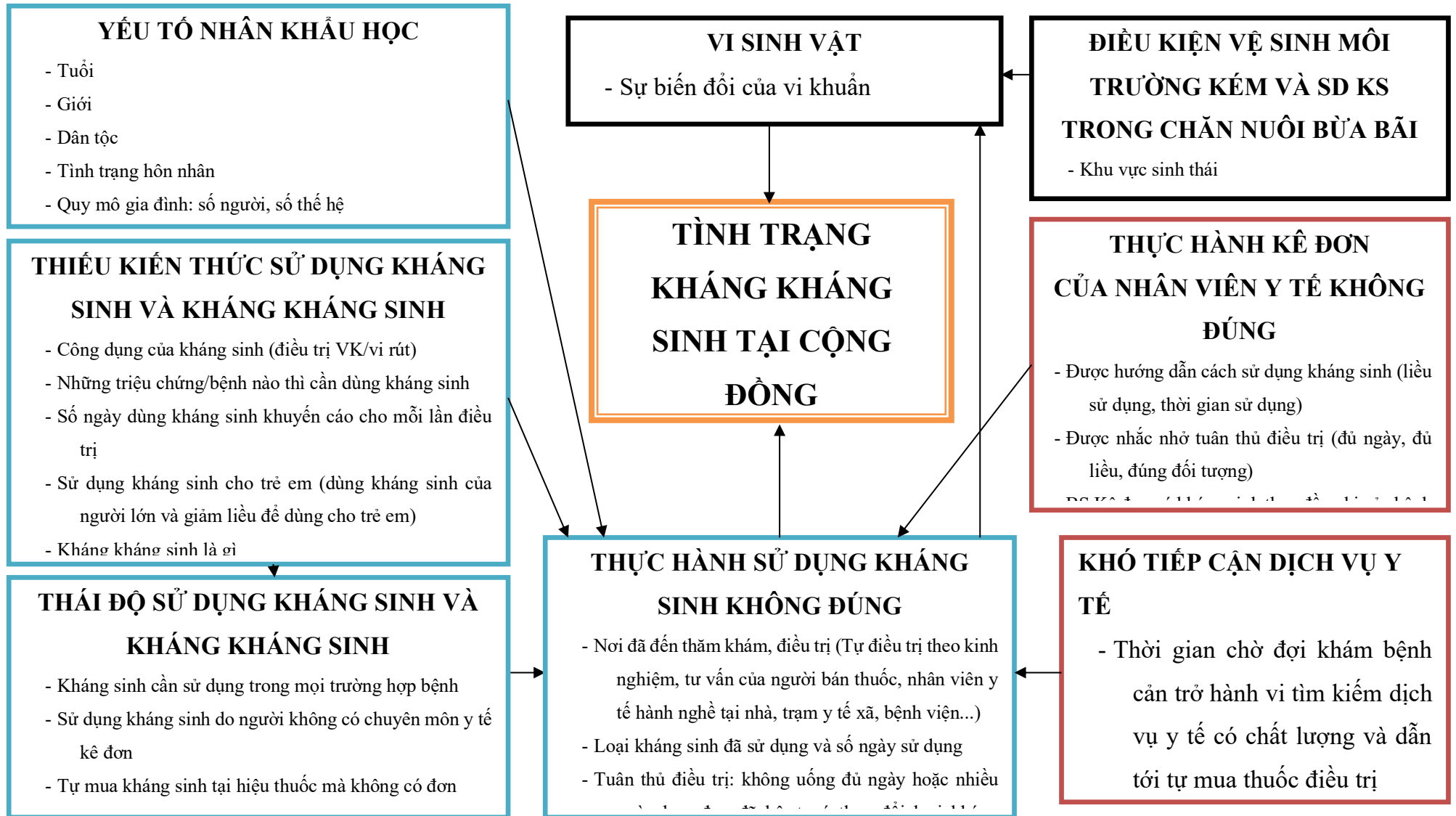
Tại Việt Nam một số nghiên cứu gần đây cho thấy vi khuẩn *E. coli* sinh ESBLs xuất hiện trên người khỏe mạnh tại cộng đồng với tỷ lệ khá cao. Nghiên cứu 162 mẫu phân lấy từ những sinh viên khỏe mạnh và 41 các nhân viên y tế các bệnh viện tại Thành phố Hồ Chí Minh cho thấy: Có 87 mẫu (53,7%) có vi khuẩn sinh ESBLs tồn tại ở đường tiêu hóa, trong đó *E. coli* chiếm đa số với tỷ lệ 82%. Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng đối tượng mang vi khuẩn sinh ESBLs ở đường tiêu hóa có tỷ lệ cao nhất là nhân viên y tế (70,7%), tiếp đến là người nhà nhân viên y tế là 69,2 % và tỷ lệ này ở sinh viên là 47,9% [6]. Nghiên cứu trên 160 mẫu phân lấy từ người khỏe mạnh tại 4 quận của Thành phố Hồ Chí Minh năm 2013 cho thấy có tới 63,1% các mẫu phân tích có chứa vi khuẩn *Enterobacteriaceae* sinh ESBLs, *E. coli* chiếm ưu thế với 63%.

Như vậy không chỉ các người bệnh đang điều trị tại bệnh viện bị nhiễm *E. coli* sinh ESBLs mà các đối tượng có nguy cơ lây nhiễm cao từ bệnh viện như nhân viên y tế và người nhà của họ cũng có tỷ lệ nhiễm các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBLs tương đối cao. Thậm chí tình trạng nhiễm vi khuẩn này còn có nguy cơ lan rộng ra cộng đồng. Người mang các chủng vi khuẩn sinh ESBLs trong đường tiêu hóa là mang một yếu tố nguy cơ cho sức khỏe vì các nhiễm khuẩn tiết niệu và nhiễm khuẩn ổ bụng hầu hết đều do *E. coli* nội sinh. Ngoài ra, việc tăng tỷ lệ

người mang vi khuẩn sinh ESBLs trong đường tiêu hóa sẽ làm tăng nguy cơ nhiễm cho những người khác thông qua một trường, làm tăng tỷ lệ các gen kháng thuốc và giúp cho các vi khuẩn nhạy cảm dễ dàng tiếp nhận gen kháng thuốc hơn. Điều đáng lo ngại hơn, những người khỏe mạnh mang vi khuẩn sinh ESBLs trong đường tiêu hóa chính là nguồn tàng trữ và lan truyền vi khuẩn này trong cộng đồng vì không ai, kể cả bản thân họ biết rằng mình đang mang vi khuẩn đa kháng thuốc trong người. Đây là vấn đề đáng báo động không chỉ cho ngành y tế mà còn cho các cơ quan chức năng. Tuy nhiên hiện nay vấn đề chưa có nhiều số liệu được công bố vì vậy việc tìm hiểu các thông tin này là hết sức cần thiết. Nó giúp cho ngành y tế cũng như các cơ quan chức năng thấy được mức độ nguy hiểm của tình trạng lưu hành các vi khuẩn kháng kháng sinh trong cộng đồng, từ đó tìm ra các biện pháp cấp bách và cụ thể để hạn chế đến mức thấp nhất sự lan truyền các vi khuẩn này, nhằm bảo vệ sức khỏe cho cộng đồng.

1.3. Kiến thức của người dân về kháng sinh và sử dụng kháng sinh

Theo các nghiên cứu và nhận định của TCYTTG, nhận thức và hiểu biết về sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh là một trong những yếu tố làm gia tăng tình trạng kháng kháng sinh ở các quốc gia [230]. Các yếu tố khác có thể làm gia tăng tình trạng kháng kháng sinh được thể hiện tại khung lý thuyết tại Hình 1.7 Do đó việc tăng cường nhận thức và sử dụng đúng kháng sinh luôn là một trong những mục tiêu quan trọng trong kế hoạch hành động phòng chống kháng kháng sinh của toàn cầu cũng như các quốc gia và cần thiết phải có các đánh giá và nghiên cứu về thực trạng kiến thức của người dân về sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh. Vào năm 2015, TCYTTG đã tiến hành một cuộc khảo sát về nhận thức cộng đồng đa quốc gia ở 12 quốc gia, mỗi quốc gia thuộc 6 khu vực của TCYTTG. Trong khu vực Đông Á, Ấn Độ và Indonesia là hai quốc gia được lựa chọn. Theo kết quả của nghiên cứu này, một tỷ lệ lớn người được hỏi nhầm tưởng thuốc kháng sinh có thể điều trị bằng các loại nhiễm khuẩn do vi rút, đặc biệt là viêm họng (70%) và cảm lạnh và cúm (64%). Đa phần người được hỏi đều trả lời sai (75%) việc sử dụng kháng sinh do bạn hoặc thành viên gia đình đưa cho để điều trị các bệnh có cùng triệu chứng, tỷ lệ này khác nhau ở các quốc gia, các quốc gia thu nhập cao có tỷ lệ hiểu biết đúng cao hơn [29].



Hình 1.7. Cây vấn đề mô tả các yếu tố liên quan đến tình trạng KKS

Châu Âu đã xây dựng hệ thống theo dõi các chỉ số về kiến thức về sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh[90]. Theo báo cáo này năm 2016, chỉ có khoảng một phần tư (24%) người châu Âu đưa ra câu trả lời chính xác cho 4 câu hỏi về thuốc kháng sinh và tỷ lệ trả lời đúng trung bình của người châu Âu là 2,5 trên 4. Những con số này tương tự với số liệu được ghi nhận vào năm 2013. Hầu hết người châu Âu (84%) nhận thức được rằng việc sử dụng KS không cần thiết khiến thuốc trở nên mất tác dụng, và một tỷ lệ tương tự (82%) biết rằng bạn chỉ nên ngừng dùng thuốc kháng sinh sau khi đã uống hết liều lượng được chỉ định. Tuy nhiên, ít hơn một nửa (43%) người châu Âu biết rằng thuốc kháng sinh không có hiệu quả đối với vi rút, và chỉ hơn một nửa (56%) biết rằng chúng không có hiệu quả đối với cảm lạnh và cúm[90]. Đến năm 2018, các chỉ số này gần như không thay đổi trừ một chỉ số được cải thiện đáng kể, đó là chỉ số về số người được hỏi biết rằng việc dùng thuốc kháng sinh thường dẫn đến các tác dụng phụ, chẳng hạn như tiêu chảy (68%) và thuốc kháng sinh không có tác dụng chống cảm lạnh (66%)[89].

Các quốc gia có thu nhập cao khác cũng đã tạo ra bằng chứng về kiến thức và nhận thức về việc sử dụng kháng sinh trong cộng đồng dân cư nói chung. Một nghiên cứu tại Thụy Sĩ cho thấy trong số những người được hỏi, 19,1% đồng ý rằng thuốc kháng sinh chữa cảm lạnh thông thường nhanh hơn; niềm tin này cao hơn ở những người trước đó không được dùng kháng sinh. Một tỷ lệ cao, 80,7%, đồng ý rằng vi khuẩn có thể trở nên kháng thuốc kháng sinh [45]. Nghiên cứu tương tự ở Ba Lan, đại đa số đều biết rằng kháng sinh tiêu diệt vi khuẩn (80%) [179]. Một nghiên cứu ở Đức, trong số những người được hỏi thì có 22,9% đồng ý với tuyên bố rằng thuốc kháng sinh của bạn bè có thể được sử dụng miễn là chúng được sử dụng để điều trị cùng một căn bệnh [237].

Tại các quốc gia có thu nhập thấp thì hiểu biết về sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh thấp hơn nhiều so với các quốc gia Châu Âu. Một nghiên cứu tại Lithuania cho thấy, gần một nửa số người được hỏi xác định không chính xác thuốc kháng sinh có hiệu quả trong điều trị nhiễm trùng do vi rút (26,0%) hoặc hỗn hợp (vi khuẩn và vi rút) (21,7%); 41,7% cho rằng cảm lạnh thông thường là một dấu hiệu thích hợp cho việc sử dụng kháng sinh [216]. Một nghiên cứu ở Thái Lan cho thấy, một nửa số người được hỏi (52,3%) đã trả lời sai cho tuyên bố rằng thuốc kháng sinh có thể chữa khỏi các triệu chứng cảm lạnh và cúm thông thường; và 49,8% người được hỏi nghĩ sai rằng thuốc kháng sinh có thể tiêu diệt vi rút.

Gần một nửa số người được hỏi (47,4%) không biết rằng việc sử dụng quá nhiều thuốc KS có thể dẫn đến các tác dụng phụ như tiêu chảy[78]. Một nghiên cứu ở Kuwait cho thấy hơn một nửa số người được hỏi đồng ý chính xác rằng 'thuốc kháng sinh giúp tăng tốc độ phục hồi sau hầu hết các trường hợp ho và cảm lạnh' và 'thuốc kháng sinh có tác dụng với hầu hết các trường hợp ho và cảm lạnh' (5,4%). Một phần ba người tham gia không đồng ý rằng "kháng sinh có hiệu quả chống lại vi khuẩn" và 46,2% đồng ý sai rằng "thuốc kháng sinh có hiệu quả chống lại vi rút"[50].

Một vấn đề quan trọng khác liên quan đến sự gia tăng tình trạng kháng kháng sinh là việc tự mua thuốc, được định nghĩa là việc mua thuốc kháng sinh và tự sử dụng chúng (hoặc cho trẻ em dùng) với mục đích điều trị nhiễm khuẩn. Sự thiếu hiểu biết, không được tiếp cận với các dịch vụ y tế đủ tiêu chuẩn và sự tự chi trả dẫn tới việc tự mua thuốc kháng sinh là một hiện tượng phổ biến trên toàn thế giới; là nguyên nhân của tương tác thuốc và tình trạng kháng kháng sinh [164]. Tự dùng thuốc được báo cáo là 21% ở Lithuania, 19,8% ở Romania, 15,2% ở Tây Ban Nha[116], 21% ở Bồ Đào Nha [214] trong số các nước châu Âu. Ở các nước đang phát triển, tỷ lệ lưu hành được báo cáo cao hơn nhiều, với 79% ở Ấn Độ [151], 84% ở Pakistan [32], 78% ở Ả Rập Xê Út [39], 67% ở Nigeria[212], dao động từ 26-100% ở Bangladesh và 73–82% ở Sudan [164]. Tự mua thuốc kháng sinh là một vấn đề phức tạp do nhiều yếu tố quyết định[160], từ người bệnh, nhân viên y tế và hệ thống y tế. Các quốc gia trong Khu vực Đông Nam Á có mức độ sử dụng kháng sinh không phù hợp rất cao[163].

Tại Việt Nam, kế hoạch thực hiện Chiến lược Quốc gia của Việt Nam về kháng kháng sinh 2013–2020 (NAP) đã được ban hành, trong đó nâng cao kiến thức cộng đồng về thuốc KS và nhận thức về kháng kháng sinh là một trong sáu mục tiêu chính. Tuy nhiên chưa có nhiều số liệu về kiến thức của người dân về sử dụng KS và có các chương trình can thiệp cụ thể để tăng cường cũng như các chương trình theo dõi, giám sát cụ thể.

1.4. Các kĩ thuật phát hiện kháng kháng sinh và các kĩ thuật sinh học phân tử sử dụng trong phát hiện các gen kháng kháng sinh

1.4.1. Kĩ thuật phát hiện kháng kháng sinh

1.4.1.1. Kĩ thuật khoan giấy khuếch tán

Phương pháp này nhằm đánh giá độ nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh

Nguyên lý: kháng sinh ở trong khoanh giấy sẽ khuếch tán vào thạch. Phương pháp này nhằm đánh giá độ nhạy cảm với kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh

Kháng sinh ở trong khoanh giấy sẽ khuếch tán vào thạch Mueller-hinton có chứa các chủng vi khuẩn thử nghiệm. Mức độ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh được biểu hiện bằng đường kính các vòng vô khuẩn xung quanh khoanh giấy kháng sinh [17, 20, 280]. Kỹ thuật này đơn giản, dễ thực hiện, rẻ tiền nhưng độ chính xác không cao.

1.4.1.2. Kỹ thuật xác định nồng độ tối thiểu của kháng sinh (MIC)

Phương pháp này nhằm mục đích xác định được nồng độ kháng sinh nhỏ nhất ức chế sự phát triển của vi khuẩn giúp cho việc lựa chọn và tính toán liều KS hiệu quả

Nguyên lý: Các chủng vi khuẩn thử nghiệm được nuôi cấy trên các đĩa thạch Mueller-hinton có nồng độ kháng sinh khác nhau. Nồng độ kháng sinh tối thiểu có tác dụng ức chế vi khuẩn được xác định khi mật độ khuẩn lạc ≤ 3 [17, 280]

Đây là phương pháp rất chính xác để xác định tính nhạy cảm của kháng sinh của vi khuẩn tuy nhiên phương pháp này có kỹ thuật phức tạp, mất thời gian nên khó áp dụng trên lâm sàng.

1.4.1.3. Kỹ thuật E-test

Kỹ thuật này giúp xác định nồng độ ức chế tối thiểu của kháng sinh. Thanh giấy E-test chứa các phổ kháng sinh có các nồng độ kháng sinh khác nhau được đặt lên đĩa thạch đã được trải huyền dịch vi khuẩn, khả năng ức chế vi khuẩn ở nồng độ thấp nhất sẽ được phát hiện ở phổ kháng sinh (điểm gãy) dựa vào đó các bác sỹ có thể tính toán liều điều trị hiệu quả cho người bệnh [17, 20, 280]

Kỹ thuật E-test dễ thực hiện, cho kết quả nhanh, chính xác nhưng khá đắt tiền.

1.4.2. Các kỹ thuật sinh học phân tử phát hiện vi khuẩn mang gen kháng kháng sinh

1.4.2.1. Kỹ thuật PCR phát hiện gen kháng kháng sinh

Nguyên lý: Tổng hợp ADN trong tế bào được nhân lên theo cơ chế bán bảo tồn. Với một cặp mồi đặc hiệu, một đoạn ADN nào đó sẽ được tổng hợp sau mỗi chu kỳ nhiệt của PCR. Đoạn gen đặc hiệu sẽ được phát hiện trên thạch điện di. Đây là kỹ thuật được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như Y học, sinh học và nông nghiệp với nhiều mục đích khác nhau như phát hiện các căn nguyên gây bệnh do vi khuẩn hay phát hiện các gen kháng kháng sinh

1.4.4.2. Kỹ thuật điện di xung trường (PFGE)

Nguyên lý: Kỹ thuật này được sử dụng những enzym phù hợp để cắt ADN thành các phân đoạn khác nhau, các phân đoạn này được điện di để phân tách các đoạn từ 1-1000kb. Kỹ thuật này cho phép xác định mối liên quan và nguồn gốc của các chủng vi khuẩn ở các vùng và thời gian khác nhau dựa trên sự so sánh các đoạn ADN của các chủng vi khuẩn[28]. Hiện nay PFGE được coi là một trong các tiêu chuẩn vàng trong phân loại cũng như xác định nguồn gốc vi khuẩn. Ở Việt Nam, kỹ thuật PFGE được sử dụng để phân tích mối liên hệ về kiểu gen của các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh.

1.4.4.3. Kỹ thuật Southern blot phân tích hệ gen vi khuẩn

Kỹ thuật Ribotyping

Tất cả các chủng vi khuẩn đều có một hay nhiều ARNm phân bố quanh nhiễm sắc thể, trình tự các operon này có tính bảo tồn cao. Do vậy vi khuẩn sẽ được định loại bằng việc sử dụng các đoạn dò hướng trực tiếp tới trình tự ADN mã hóa các ARN thông tin này [27].

Kỹ thuật phân tích đa hình chiều dài giới hạn (Restriction Fragment Length Polymorphism RFLP)

Nguyên lý: ADN nhiễm sắc thể hay các plasmid của vi khuẩn sẽ được cắt bằng các enzym giới hạn thành những đoạn ADN. Các đoạn ADN sẽ được phân tách bằng điện di trên thạch, chuyển lên màng nitrocellulose, sau đó các đoạn cắt này sẽ được lai ghép với một đoạn ADN dò đặc hiệu đã được đánh dấu phóng xạ. Những đoạn ADN có trình tự axit nucleic bổ xung phù hợp sẽ gắn với đoạn dò và được phân biệt dựa vào sự khác nhau về số lượng và kích thước của các phân đoạn ADN [21, 27]. Hiện nay kỹ thuật này được sử dụng để phân tích các đặc tính sinh học phân tử của các vi khuẩn đa kháng kháng sinh.

1.4.4.4. Phân tích các plasmid

Plasmid là yếu tố ADN nằm ngoài nhiễm sắc thể của hầu hết các chủng vi khuẩn và có thể xác định qua qui trình ly giải tế bào và điện di trên thạch. Đây cũng là cơ chế kháng kháng sinh quan trọng nhất do phần lớn các gen kháng kháng sinh của vi khuẩn đều nằm trên các plasmid và có thể lây truyền trong phạm vi loài các loài vi khuẩn khác thông qua hình thức tiếp hợp.

Bảng 1.4. Plasmid mang gen kháng kháng sinh [18, 19, 23, 26]

Vi khuẩn	Loại plasmid	Gen kháng kháng sinh trên plasmid	Khả năng truyền plasmid kháng kháng sinh*
<i>E. coli</i>	FII; A/C; B/O	CTX-M, SHV, TEM và NDM-1	Có
<i>K. pneumoniae</i>	A/C; FI/FII và InCL/M	NDM-1, Oxa-48	Có
<i>S. typhimurium</i>	A/C2	CMY-2-type A	Có
<i>Citrobacter</i>	A/C, L/M	ArmA, DHA, SHV	Có
<i>Enterocloaceae</i>	A/C2	VIM-4, CMY-4	Có

* Khả năng truyền plasmid kháng kháng sinh được các tác giả thử nghiệm thành công trong phòng thí nghiệm. Các chủng “cho” là các chủng vi khuẩn mang plasmid kháng kháng sinh, và các chủng “nhận” là các chủng *E. coli* J53, DH5- α .

*** Tách chiết plasmid**

Đây là một trong các kỹ thuật đầu tiên sử dụng trong nghiên cứu sinh học phân tử về plasmid, xác định được số lượng và kích thước các plasmid trong tế bào vi khuẩn. Trên thế giới, kỹ thuật này được áp dụng rộng rãi để xác định số lượng các plasmid của các vi khuẩn kháng kháng sinh (6). Tuy nhiên kỹ thuật này có nhiều hạn chế: (1) không phân biệt được các plasmid khác loại nhưng có cùng kích cỡ, (2) các plasmid này có thể tìm thấy trong các vi khuẩn cùng và khác loài, (3) không phát hiện được plasmid mang gen kháng kháng sinh.

*** Phân loại plasmid**

Việc phát hiện và phân loại plasmid cần phải dựa vào các đặc tính về kiểu gen và dựa trên các gen có tính ổn định, đặc biệt là các gen qui định sự nhân lên của các plasmid [21]. Năm 1971 Hedges và cộng sự lần đầu tiên đưa khái niệm phân loại plasmid dựa trên tính ổn định của plasmid trong khi tiếp hợp (8;9). Năm 1988, Couturier và cộng sự đã sử dụng kỹ thuật Southern-blotting để phân loại plasmid, tuy nhiên phương pháp này có độ đặc hiệu không cao, tương đối phức tạp và không thể áp dụng để phân tích với số lượng mẫu lớn [29]. Năm 2005, Carattoli và cộng sự phát triển kỹ thuật PCR-based replicon typing, kỹ thuật này sẽ khuếch đại các đoạn gen đặc hiệu qui định sự nhân lên của các plasmid quan trọng của các vi khuẩn đường ruột [19]. Kỹ thuật này đang được nhiều tác giả sử

dụng để phân loại các plasmid mang gen kháng kháng sinh, tuy nhiên kỹ thuật này vẫn còn hạn chế do chỉ phân loại được các plasmid thuộc nhóm Inc cổ điển [19, 24].

1.4.4.5. Nghiên cứu khả năng truyền plasmid kháng kháng sinh

Thông qua hình thức tiếp hợp các plasmid sẽ được chuyển từ tế bào cho sang tế bào nhận qua ống pili thông qua hình thức bơm đẩy. Hiện nay kỹ thuật này được áp dụng rộng rãi nhằm tìm hiểu khả năng truyền plasmid mang gen kháng kháng sinh trong quần thể vi khuẩn [19, 25]. Ở Việt Nam kỹ thuật này cũng được sử dụng để phân tích đặc tính của các vi khuẩn mang plasmid kháng kháng sinh [25].

1.4.4.6. Kỹ thuật phân loại trình tự đa vị trí (Multi Locus Sequence Typing - MLST)

Đây là kỹ thuật tốt nhất để phân loại kiểu gen của nhiều loại vi khuẩn. Kỹ thuật MLST được đánh giá để phân loại kiểu gen tốt hơn kỹ thuật PFGE và RFLP và là một trong rất ít các kỹ thuật được gọi là “thư viện” để sắp xếp, phân loại và được sử dụng trong các nghiên cứu dịch tễ học của các chủng *A. baumannii*, qua đó có thể xác định các chủng gây dịch, kháng kháng sinh, hay sinh độc tố nhằm giám sát sự lây truyền của chúng trong phạm vi quốc gia và trên thế giới [28]. Kỹ thuật MLST lần đầu tiên được áp dụng khi nghiên cứu các chủng *Neisseria meningitidis* vào năm 1998. MLST thực chất là kỹ thuật giải trình tự gen nhiều locus, có độ phân biệt cao, có khả năng phát hiện sự khác nhau vài nucleotit của gen. Kỹ thuật MLST dựa trên sự phân tích đặc điểm của 5 đến 7 gen bảo tồn (“house-keeping” gene) nhưng phổ biến nhất là 7 gen bảo tồn của vi sinh vật.

Bảng 1.5. Chức năng và vị trí gen bảo tồn của *E. coli* MG1655 (Genkank số U00096) [153]

Gen	Protein	Vị trí gen
<i>adk</i>	adenylate kinase	497175 - 497819
<i>fumC</i>	fumarate hydratase	1685185 - 1686588
<i>gyrB</i>	ADN gyrase	3877705 - 3880119
<i>icd</i>	isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase	1195123 - 1196373
<i>mdh</i>	malate dehydrogenase	3383330 - 3384268
<i>purA</i>	adenylosuccinate dehydrogenase	4404687 - 4405985
<i>recA</i>	ATP/GTP binding motif	2822708 - 2823769

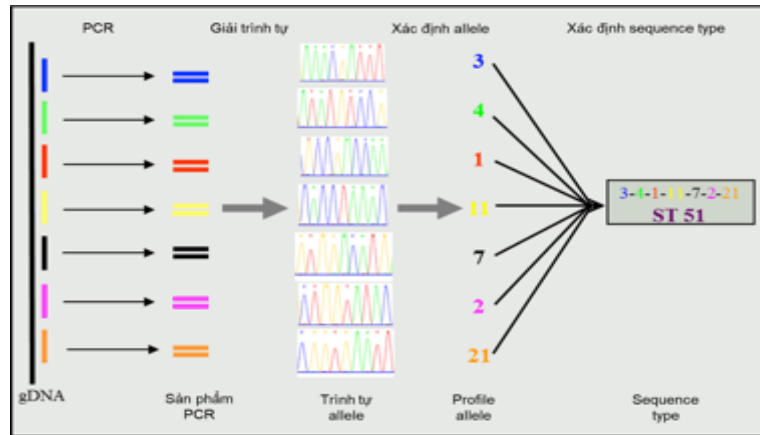
Mỗi gen bảo tồn được giải trình tự một đoạn nucleotit có độ dài 450 - 500 bp, sự biến đổi về trình tự nucleotit tạo ra các kiểu allen. Sự kết hợp của allen tạo các kiểu trình tự ST (sequence type) khác nhau, số nucleotid khác nhau giữa các allen không được xem xét. Kiểu trình tự có thể gộp thành một nhóm phức hợp dựa trên sự tương đồng về kiểu allen gọi ST complex.

Bảng 1.6. Một số kiểu trình tự ST của vi khuẩn *E. coli*. Nguồn:
<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>

ST	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>
1	4	2	2	4	4	4	4
2	5	3	2	6	5	5	4
3	6	4	3	7	7	7	6
10	10	11	4	8	8	8	2
11	12	12	8	12	15	2	2
12	13	13	9	13	16	10	9
13	6	6	5	9	9	8	2
14	14	14	10	14	17	7	10
20	6	4	3	7	7	7	6
62	10	11	4	8	8	18	2
414	18	22	20	23	5	15	4
457	101	88	97	108	26	79	2
678	6	6	5	136	9	7	7
6350	267	6	5	13	9	13	98
6353	576	186	186	498	626	1	1

Dựa vào 7 gen bảo tồn xác định kiểu allen, hiện nay xác định được 6356 kiểu trình tự ST [102].

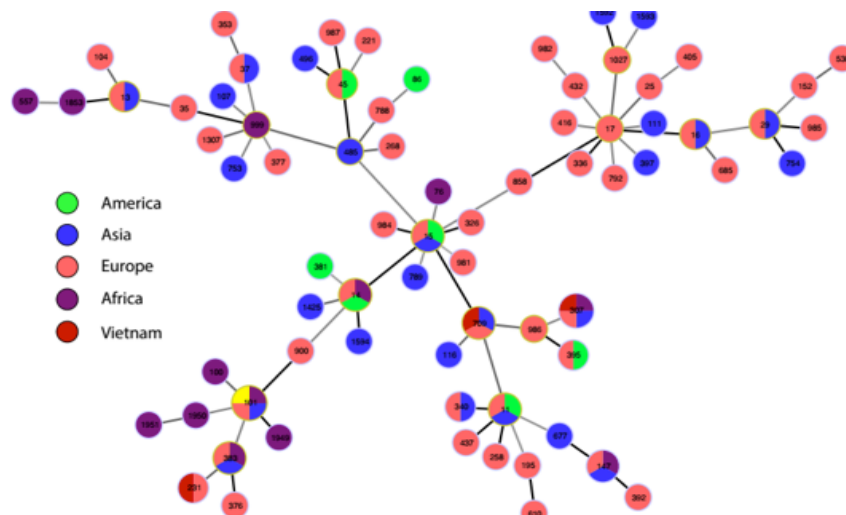
Các bước chính trong quá trình xác định sequence type của một chủng vi khuẩn được tóm tắt trong Hình 1.7.



Hình 1.8. Tóm tắt các bước xác định sequence type của một chủng vi khuẩn bằng kỹ thuật MLST

Các chủng khác nhau sẽ có profile khác nhau và do đó có ST khác nhau. Hầu hết các loài vi khuẩn đều có khá nhiều allele của mỗi gen giữ nhà. Điều này cho phép tạo ra hàng tỉ tổ hợp housekeeping genes khác nhau.

Để phân tích các dữ liệu thu được từ MLST, người ta sẽ đối chiếu ST của chủng vi khuẩn nghiên cứu với cơ sở dữ liệu và phân bố của các ST khác trên thế giới. Những ST gần giống nhau (khác biệt ở 1 hoặc 2 locus gen) sẽ được nhóm lại tạo thành một clonal complex [104]. Mỗi liên hệ giữa các ST sẽ được biểu diễn ở dạng biểu đồ (Hình 1.8). Dựa vào biểu đồ này người ta có thể dễ dàng xác định được mối liên hệ giữa các chủng vi khuẩn theo nhiều biến số khác nhau như năm phân lập, địa điểm phân lập, loại bệnh v.v.



Hình 1.9. Biểu đồ biểu diễn mối liên hệ giữa các sequence type khác nhau

Ưu điểm của phương pháp: dữ liệu trình tự rất rõ ràng và có thể dễ dàng so sánh đối chiếu với cơ sở dữ liệu trên mạng; profile allele của các gen giữ nhà còn có thể được xác định trực tiếp từ mẫu lâm sàng như dịch não tủy hay máu [266].

Nhược điểm của phương pháp: tốn thời gian và chi phí cao.

Phương pháp này ngày càng được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu và là một công cụ hiệu quả trong các nghiên cứu về dịch tễ học phân tử của các chủng vi khuẩn gây bệnh. Nhờ kỹ thuật này mà ta có thể theo dõi sự phân bố và lan truyền của các chủng vi khuẩn, cung cấp nguồn thông tin quý báu để đề xuất các giải pháp can thiệp [215].

1.4.4.8. Kỹ thuật giải trình tự gen

Trong nghiên cứu vi khuẩn kháng kháng sinh, kỹ thuật giải trình tự gen được sử dụng rộng rãi để giải trình tự các gen kháng kháng sinh cũng như phân tích các plasmid mang gen kháng kháng sinh. Đây là một phương pháp chính xác nhất để xác định các đặc tính kháng kháng sinh của vi khuẩn.

Phương pháp giải trình tự gen của Sanger bằng điện di mao quản vẫn luôn được coi là chuẩn vàng trong các phương pháp giải trình tự gen hiện nay. Trong lĩnh vực nghiên cứu về kháng kháng sinh, phương pháp này chủ yếu được sử dụng để giải trình tự các gen kháng vì các gen này thường có kích thước < 2 kb. Tuy nhiên với nhu cầu tìm hiểu cấu trúc của các yếu tố di truyền di động (4 ~ 10 kb) hay các plasmid mang gen kháng có kích thước từ vài chục đến hàng trăm kb thì phương pháp này lại không đáp ứng được.

Các phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới lần đầu ra đời vào năm 2005 đã khắc phục những hạn chế của phương pháp giải trình tự truyền thống trước đó. Không chỉ có tốc độ lớn mà kỹ thuật mới này còn cho phép thực hiện song song một số lượng lớn trình tự trong vòng vài tuần mà nếu dùng phương pháp Sanger sẽ phải mất đến hàng năm mới có thể hoàn thành. Mặc dù phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới sẽ chỉ tạo ra các đoạn trình tự (read) ngắn hơn và có độ chính xác thấp hơn so với các đoạn ADN được giải trình tự bằng phương pháp Sanger nhưng bù lại với số lượng read rất lớn bao phủ khắp vùng ADN cần giải trình tự sẽ được ráp lại để có trình tự ADN cuối cùng với độ chính xác cao hay còn gọi là giải trình tự toàn bộ hệ gen (Whole Genome Sequence - WGS).

Độ chính xác của kỹ thuật WGS phụ thuộc rất nhiều vào bước phân tích dữ liệu thu được từ quá trình giải trình tự. Độ tin cậy của dữ liệu thường được căn cứ vào coverage. Coverage được sử dụng cho mục đích so sánh các hệ gen để tìm sự khác biệt ở từng nucleotide là 20X [251].

1.5. Vai trò của sinh học phân tử trong giải quyết các vấn đề y tế công cộng và nghiên cứu các vi khuẩn kháng kháng sinh

1.5.1. Vai trò của sinh học phân tử trong giám sát kháng kháng sinh

Giám sát là nền tảng trong việc kiểm soát các bệnh truyền nhiễm [49]. Kỹ thuật WGS đã cung cấp cái nhìn sâu sắc về sự xuất hiện và lan truyền của kháng kháng sinh [30]. *Mycobacterium abscessus* là một ví dụ điển hình, nghiên cứu mức độ phân tử cho thấy mô hình lây truyền của nó có sự thay đổi. Có sự lây truyền vi khuẩn mycobacteria ngoài lao ở các người bệnh xơ phổi trong bệnh viện. Mặc dù với những người bệnh này đã được kiểm soát nhiễm trùng rất nghiêm ngặt để tránh mắc các bệnh nhiễm trùng khác (ví dụ *P. aeruginosa*, một tác nhân được cho rằng có thể lây truyền giữa các người bệnh). Tuy nhiên ở các người bệnh được kiểm soát chặt chẽ này người ta vẫn thấy sự lây bệnh. Điều quan trọng là, nó bao gồm việc lây truyền các chủng kháng macrolide trong môi trường mà chủng *M. abscessus* vẫn còn nhạy với kháng sinh [41]. Điều này chứng tỏ có sự lây nhiễm chéo ở mức độ phân tử của vi khuẩn *M. abscessus* kháng thuốc giữa người bệnh với nhóm người bệnh của bệnh khác. Dẫn đến việc, ngay sau đó tại các bệnh viện ở châu Âu phải thay đổi lại hướng dẫn giám sát, sàng lọc người bệnh xơ phổi và các nghiên cứu liên quan đến vấn đề này tiếp tục được nghiên cứu ở Anh và một số nước.

Vai trò của nghiên cứu mức độ sinh học phân tử đã nhấn mạnh tầm quan trọng của sự lây lan giữa các quốc gia của các sinh vật kháng kháng sinh [30]. chủng *P. aeruginosa* Liverpool đã được chứng minh là lây truyền giữa các phòng khám CF ở Anh và Bắc Mỹ [37]. Sự phát triển của khả năng kháng fluoroquinolone trong dòng EMaphA-15 của *Staphylococcus aureus* (MRSA) kháng methicillin vào giữa những năm 1980 trước sự lan truyền đại dịch của biến thể này [30]. Tương tự như vậy, việc thu được kháng fluoroquinolone đã được xác định là một thay đổi di truyền quan trọng liên quan đến sự xuất hiện của hai dòng dịch *Clostridium difficile* (02/BI/ NAP1) vào đầu những năm 2000 [35].

Các nghiên cứu sử dụng WGS lớn cũng đã bắt đầu làm sáng tỏ mối liên quan giữa người và động vật. Trong suốt những năm 1990, *Salmonella Typhimurium* DT104 đa kháng thuốc là nguyên nhân gây ra dịch bệnh toàn cầu [38]. Trái ngược với các nguyên lý trước đây, một so sánh giữa các phân lập theo chiều dọc của người và gia súc từ Scotland đã chứng minh rằng nhiễm trùng ở người không phải chủ yếu do lây truyền từ động vật địa phương. Thay vào đó,

quần thể người và động vật Typhimurium DT104 ở Scotland phần lớn khác biệt, điều này cho thấy các nguồn lây nhiễm khác, như thực phẩm nhập khẩu, là nguyên nhân gây bệnh cho con người [38]. Ngược lại, WGS đã chứng minh rằng CC398 MRSA có liên quan đến vật nuôi có nguồn gốc từ *S. aureus* nhạy cảm với methicillin và mắc phải kháng methicillin DST [48].

1.5.2. Vai trò của sinh học phân tử để xác định nguồn lây của vi khuẩn kháng kháng sinh

1.5.2.1 Các nghiên cứu xác định nguồn lây vi khuẩn kháng kháng sinh từ bệnh viện ra cộng đồng

Kháng kháng sinh được cho là lây lan từ bệnh viện ra cộng đồng thông qua người bệnh từng nằm viện hoặc được nhận chăm sóc y tế và từ rác thải y tế không được xử lý đầy đủ. Một số nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại để chứng minh sự lây lan của vi khuẩn kháng thuốc từ bệnh viện ra cộng đồng [100].

Bệnh viện được coi là nơi chứa vi khuẩn kháng thuốc chính. Đường ruột là ổ chứa vi khuẩn kháng thuốc chính ở những người bệnh nhập viện. Một trong những tác dụng phụ của điều trị kháng sinh là khả năng lựa chọn hệ vi sinh vật kháng thuốc. Hệ vi sinh vật bị thay đổi này có thể gây ô nhiễm môi trường bệnh viện và từ đó lây đến các người bệnh nhập viện và bề mặt khác qua ô nhiễm chéo. Khoảng 20% -40% các ca nhiễm trùng bệnh viện có thể chủ yếu là do lây nhiễm chéo qua bàn tay của nhân viên y tế [281]. Hoặc người bệnh có thể bị nhiễm mầm bệnh bệnh viện khi tiếp xúc trực tiếp với các bề mặt hoặc thiết bị bị ô nhiễm. Trong một số trường hợp, mức độ lây truyền từ người bệnh sang người bệnh tỷ lệ thuận với mức độ ô nhiễm môi trường bệnh viện. Nghiên cứu gần đây cho thấy khả năng sống sót sau vài tuần của vi khuẩn *E. coli* và *K. pneumoniae* đa kháng trên bề mặt thép không gỉ. Thú vị hơn, các nhà nghiên cứu cũng chứng minh rằng lây truyền ngang qua trung gian plasmid của các gen β -lactamase xảy ra khi các tế bào của người cho và người nhận được trộn lẫn trên thép không gỉ. Nghiên cứu này chứng minh rằng khả năng của mầm bệnh tồn tại trong môi trường bệnh viện, đặc biệt là trên bề mặt tiếp xúc, có thể đóng một vai trò quan trọng trong di truyền ngang của gen kháng [279]. Trong trường hợp này, việc sử dụng kháng sinh quá mức và không hợp lý góp phần vào sự tồn tại của vi khuẩn kháng thuốc trong môi trường [223]. Hơn nữa, việc làm sạch và vệ sinh môi trường không đầy đủ giúp duy trì các vi sinh vật này trong môi trường. Áp lực kháng sinh cũng biến chất

thải bệnh viện thành một nguồn kháng kháng sinh tiềm tàng trong môi trường bên ngoài bệnh viện. Thuốc kháng sinh được sử dụng trong bệnh viện chủ yếu được thải ra môi trường nước không chuyển hóa qua nước thải, góp phần làm tăng tỷ lệ kháng thuốc trong môi trường [56].

Số liệu từ nghiên cứu của ANSORP cũng cho thấy khả năng lây lan của MRSA từ bệnh viện ra cộng đồng tại các nước Hàn Quốc, Đài Loan, Thái Lan, Việt Nam và Srilanka. Số liệu MLST cho thấy các STs như ST239 và ST5 chiếm đa số trong các chủng MRSA bệnh viện trong tại các nước này nhưng cũng được ghi nhận trên một số chủng MRSA cộng đồng không có yếu tố nguy cơ nào liên quan đến bệnh viện. Nhóm nghiên cứu sau đó sử dụng kỹ thuật PFGE để phân tích một số chủng MRSA mang ST5 và ST239. Kết quả các chủng MRSA cộng đồng mang ST5 tại Hàn Quốc và Đài Loan, mang ST239 tại Hàn Quốc, Đài Loan, Thái Lan và Hồng Kông có liên quan tới các chủng MRSA bệnh viện mang ST5 và ST239 ở cùng các quốc gia này [253].

Nghiên cứu của Hàn Quốc thực hiện năm 2016 tại 2 bệnh viện trên các chủng *E. coli* phân lập từ người bệnh nhiễm khuẩn cộng đồng cũng báo cáo khả năng lây lan của *E. coli* KKS từ bệnh viện ra cộng đồng [145]. Nghiên cứu được thực hiện trên 213 chủng *E. coli* sinh ESBL thu thập trong vòng 48h từ các người bệnh nhập viện và được phân loại như sau: Chủng được coi là chủng bệnh viện nếu người bệnh có tiền sử nằm viện hay lọc máu hay hoá trị tĩnh mạch trong vòng 30 ngày trước đó; hoặc nằm viện trên 2 ngày để điều trị tích cực trong vòng 90 ngày trước đó. Các chủng phân lập từ người bệnh không có các đặc điểm này được coi là chủng cộng đồng. Kết quả ghi nhận 94 chủng bệnh viện và 119 chủng cộng đồng. ST131 được phát hiện trên 26,9% (32/119) chủng cộng đồng và 27,7% (26/94) chủng bệnh viện. Trong khi đó, 44,1% (94/213) số người bệnh được tuyển chọn vào nghiên cứu này có tiền sử liên quan đến bệnh viện. Vì vậy có thể cho rằng có sự lây lan của *E. coli* sinh ESBLs từ bệnh viện ra cộng đồng (và ngược lại).

Nghiên cứu về kháng kháng sinh trong bệnh viện rất nhiều và phong phú. Các kỹ thuật hiện đại, mới trong nghiên cứu kháng kháng sinh thường được đưa vào áp dụng trên các chủng vi khuẩn thu được từ bệnh viện đầu tiên. Các nghiên cứu cho thấy khả năng lây lan của gen kháng trong nội bộ bệnh viện cũng như giữa các bệnh viện.

Một nghiên cứu năm 2020 tại một bệnh viện tại Phần Lan, người ta phát hiện 11 người bệnh nhiễm *Enterococcus faecium* kháng vancomycin. Kết quả PCR cho thấy các chủng này đều mang gen kháng *vanB*. Kết quả PFGE đã xác định các chủng này thuộc về 4 nhóm khác nhau trong đó có 1 nhóm chiếm đa số với 7 chủng, 7 chủng này đều mang gen đặc điểm phân tử của gen *vanB* giống nhau. Số liệu này gợi ý rằng có sự lan truyền dọc giữa 7 chủng và truyền ngang với các chủng khác của gen *vanB* qua plasmid và/hoặc transposon [140].

Nghiên cứu tại khoa Nhi một bệnh viện của Đức trên 3 bệnh nhi. Kỹ thuật PCR 3 chủng đều cho kết quả vi khuẩn mang các gen *vanA*, *erm(B)*, *tetM*, *tetL* và *aadE-aphA-3*. Phân tích PFGE cho thấy cả 3 chủng đều thuộc về 1 nhóm. Từ các kết quả này kết hợp cùng một số kỹ thuật khác, nhóm nghiên cứu cho rằng có sự lan truyền các gen kháng trong nhóm bệnh nhi nói trên [282].

Nghiên cứu tại 3 bệnh viện của Tehran, Iran năm 2009-2010 trên 44 chủng MRSA phân lập từ người bệnh nhập viện và 16 chủng MRSA phân lập từ dụng cụ và môi trường bệnh viện cho thấy 85% số chủng có kiểu gen được phát hiện ở nhiều hơn 1 bệnh viện, ở một số bệnh viện một số chủng được phân lập từ các khoa khác nhau. Điều này cho thấy sự lây lan của gen kháng trong nội bộ bệnh viện và giữa các bệnh viện với nhau [136].

Nghiên cứu được thực hiện tại bệnh viện trường đại học của Trung Quốc trên các chủng *K. pneumoniae* mang gen mã hoá sinh carbapenemase thu được trong 3 tháng năm 2013-2014 cho thấy tất cả các chủng đều mang gen KPC-2. Kết quả phân tích PFGE và MLST cho thấy tất cả các chủng đều thuộc chung 1 nhóm ST11 và có độ tương đồng trên 92%, cho thấy khả năng có sự lây lan của gen này trong bệnh viện [255]. Kết quả này tương đồng với một nghiên cứu khác tiến hành sau đó cũng tại 1 bệnh viện ở nước này. Nghiên cứu được thực hiện trên 72 chủng *K. pneumoniae* mang gen mã hoá sinh carbapenemase mang gen KPC-2 thu thập từ 15 khoa phòng của bệnh viện trong 3 năm 2012-2014. Kết quả MLST cho thấy ST11 là phổ biến nhất trong số các chủng thu thập được (57/72). Áp dụng kỹ thuật PFGE trên 57 chủng này cho thấy có tới 47 chủng có độ tương đồng trên 80%, cho thấy sự lây lan của gen này trong nội bộ bệnh viện cũng như giữa các bệnh viện do ST11 cũng được báo cáo ở các bệnh viện khác [83].

Nghiên cứu tại Bệnh viện 108 năm 2014-2015 trên 264 chủng vi khuẩn kháng carbapenem. Kỹ thuật PCR đã xác định sự có mặt của các gen mã hóa carbapenemase, 48,11% số chủng mang gen này. Kỹ thuật PFGE trên một số

chúng chọn ngẫu nhiên trong nhóm mang gen KPC và OXA-48 cho thấy các plasmid mang gen KPC và OXA-48 ở các chủng khác nhau đều có kích thước tương đương chứng tỏ sự lây lan của các gen này rất có thể đều bắt nguồn từ một plasmid, trong khi đó các plasmid mang gen NDM-1 có sự đa dạng về kích thước và được phát hiện trên nhiều loài vi khuẩn khác nhau chứng minh khả năng truyền gen ngang đã xảy ra giữa các chủng vi khuẩn trong bệnh viện. Kỹ thuật PFGE trên các chủng *E. coli* cho thấy có 1 nhóm genotype gồm 3 chủng phân lập tại 3 khoa khác nhau (trong đó 1 chủng năm 2014, 2 chủng năm 2015) có độ tương đồng về kiểu gen >80%, trên các chủng *K. pneumonia* cho thấy có 1 nhóm genotype gồm 2 chủng được phân lập ở 1 khoa vào cùng thời điểm, các nhóm genotype còn lại đều bao gồm các chủng được phân lập ở các khoa khác nhau cùng năm hoặc vào 2 năm khác nhau. Sự tương đồng về kiểu gen giữa các chủng được phân lập tại các khoa khác nhau vào những thời điểm khác nhau cho thấy nguy cơ lây lan chủng KKS giữa các khoa trong cùng 1 bệnh viện [1].

1.5.2.2 Các nghiên cứu xác định nguồn lây vi khuẩn kháng kháng sinh từ cộng đồng vào bệnh viện.

Về nguyên tắc, các mầm bệnh bệnh viện được coi là nguồn gốc của các mầm bệnh kháng thuốc đã được phát hiện trong cộng đồng. Tuy nhiên, ngày càng có nhiều bằng chứng về tầm quan trọng của cộng đồng như là nguồn gốc của các mầm bệnh đa kháng kháng sinh được đưa vào bệnh viện. Kháng kháng sinh trong cộng đồng có thể lây lan vào bệnh viện thông qua các người bệnh nhập viện. Nghiên cứu tại 17 bệnh viện tại Mỹ và cộng đồng xung quanh 17 bệnh viện này năm 2000 cho thấy có mối liên hệ giữa lượng kháng sinh fluoroquinolones sử dụng trong cộng đồng với tỷ lệ *E. coli* kháng fluoroquinolones trong bệnh viện ở khu vực dân cư đó. Đây là một kết quả quan trọng gợi ý sự lan truyền của *E. coli* kháng kháng sinh từ cộng đồng vào bệnh viện vì một nghiên cứu trước đó đã cho thấy 73% số chủng *E. coli* kháng quinolon phân lập được trong bệnh viện của nghiên cứu đó có nguồn gốc từ cộng đồng [170]. Giả thuyết này cũng được ủng hộ bởi nghiên cứu của Đức tại bệnh viện đại học y trong 2 năm 2005-2007. Nghiên cứu này cũng theo dõi số lượt người bệnh nhập viện có nhiễm khuẩn sinh ESBLs và số ca nhiễm khuẩn bệnh viện do tác nhân sinh ESBLs. Kết quả cho thấy nếu số người bệnh nhập viện có nhiễm khuẩn ESBLs có thay đổi 1% sẽ dẫn tới thay đổi 0,9% số ca nhiễm khuẩn bệnh viện do tác nhân sinh ESBLs [138]. Nghiên cứu tương tự tại Thụy Sĩ năm 2000-2007 cũng củng cố thêm vai trò của việc sử dụng

kháng sinh trong cộng đồng tới tỷ lệ *E. coli* kháng kháng sinh trong bệnh viện [275].

Nghiên cứu hồi cứu trên 2.162 chủng *S. aureus* kháng methicillin (MRSA) giai đoạn 2004-2006 của mạng lưới giám sát tác nhân kháng khu vực Châu Á (ANSORP) được thực hiện tại 17 bệnh viện tại 7 quốc gia trong khu vực như Hàn Quốc, Đài Loan, Hồng Kông, Thái Lan, Philippin, Việt Nam, Ấn Độ và Srilanka [253]. Các chủng được phân loại là MRSA cộng đồng nếu nhiễm khuẩn xảy ra trong cộng đồng hoặc dưới 48 giờ sau khi nhập viện và không có các tiền sử liên quan đến bệnh viện; là MRSA bệnh viện nếu người bệnh từng nằm viện dài ngày, phẫu thuật hoặc can thiệp ngoại khoa trong vòng 12 tháng trước đó. Kết quả phân tích MLST gợi ý khả năng lây lan của MRSA từ cộng đồng vào bệnh viện tại một số nước như Đài Loan, Hồng Kông, Việt Nam, Philippin và Hàn Quốc khi một số chủng mang các ST tương đồng giữa bệnh viện và cộng đồng là ST59, ST30 và ST72 trong khi các ST này là các điển hình trên MRSA cộng đồng. Kết quả này phù hợp với kết quả của nghiên cứu thực hiện tại Đài Loan năm 1999-2005 khi cũng ghi nhận các ST59 trên các chủng MRSA bệnh viện [130].

1.5.2.3 Nghiên cứu xác định sự lây truyền vi khuẩn kháng kháng sinh từ động vật sang người.

Từ nhiều năm trước, một số nghiên cứu đã chỉ ra mối nghi ngờ về khả năng lây lan của vi khuẩn kháng kháng sinh từ nông nghiệp sang người. Sản xuất thức ăn chăn nuôi công nghiệp là môi trường lý tưởng cho việc chọn lọc và chia sẻ các gen kháng thuốc. Việc sử dụng chất kháng sinh làm chất phụ gia thức ăn thường dẫn đến việc sử dụng thuốc điều trị dưới mức cho động vật được nuôi trong điều kiện không hợp vệ sinh, một kịch bản tối ưu cho việc lựa chọn chất đề kháng. Hơn nữa, việc xử lý chất thải không hoàn chỉnh hoặc hầu như không thực hiện dẫn đến việc phổ biến chất kháng thuốc vào môi trường và con người [252]. Việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi đã đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển và lây lan của *Salmonella* đa kháng [219]. Hơn nữa, có nhiều báo cáo trên toàn thế giới về sự hiện diện của vi khuẩn kháng thuốc trong các sản phẩm thịt tiêu dùng, bao gồm thịt gia cầm, thịt bò và thịt lợn [110]. Trong một nghiên cứu từ Seville (Tây Ban Nha) và Pittsburg (Mỹ), một tỷ lệ cao *E. coli* sản xuất ESBLs được phát hiện trong thịt bán lẻ của cả hai quốc gia [99].

Một số tác giả đã báo cáo sự xuất hiện của một dòng di truyền của MRSA được gọi là ST398, ban đầu có liên quan đến động vật trang trại [252], đang được

phát hiện với một số lo ngại trong các mẫu thức ăn động vật (đặc biệt là thịt và sữa). Hơn nữa, loài này thường xuyên được phát hiện ở người khi tiếp xúc với động vật trang trại có thể truyền bệnh cho cộng đồng. Sử dụng dữ liệu giám sát bệnh viện, một nghiên cứu cho thấy việc tiếp xúc nghề nghiệp với động vật trang trại hoặc gần trang trại là một yếu tố nguy cơ lây nhiễm MRSA[273]. Vật nuôi trong nhà là một ổ chứa vi khuẩn đa kháng thuốc khác. Trong một nghiên cứu gần đây *Enterobacteriaceae* sản xuất ESBLs có mặt ở chó và mèo khỏe mạnh, đặc biệt là những con có tiền sử điều trị kháng sinh trước đó [108].

Nghiên cứu của Benzason năm 1984 đã mô tả sự lây lan của chủng vi khuẩn kháng kháng sinh qua từ mẹ sang con khi bà mẹ này uống sữa tươi chưa tiệt trùng và đứa trẻ đã nhiễm *Salmonella typhimurium* kháng kháng sinh trong vòng 24h sau khi chào đời. Chủng này sau đó còn lây lan sang một số trẻ sơ sinh khác ở nhà hộ sinh này [16]. Các gen kháng các loại kháng sinh chỉ dùng trên động vật như apramycin được tìm thấy không chỉ trên động vật mà trong cả hệ vi khuẩn chí đường ruột của con người, trên các tác nhân lây truyền bệnh động vật sang người như *Salmonella* và trên cả các tác nhân chỉ gây bệnh trên người như *Shigella*. Rõ ràng là đã có sự truyền gen kháng kháng sinh giữa vi khuẩn gây bệnh trên người và trên động vật [270].

Mối liên hệ giữa việc sử dụng kháng sinh trên động vật và sự lây lan của vi khuẩn kháng thuốc từ động vật sang người đã được Hummel và cộng sự mô tả chi tiết trong báo cáo năm 1986. Theo đó, năm 1982, kháng sinh streptotricin được phép bổ sung vào thức ăn cho lợn. Kháng sinh này không được sử dụng trên người. Chỉ một năm sau đó, hiện tượng kháng streptotricin đã được ghi nhận trên các chủng *E. coli* trong phân lợn được nuôi bằng loại thức ăn chứa kháng sinh này. Gen kháng nằm trên 1 transposon Tn1825. Hai năm sau đó, transposon này được phát hiện không chỉ trong phân của nông dân nuôi lợn, các thành viên khác trong gia đình mà cả phân của những người dân trong khu vực và cả trong các chủng *E. coli* phân lập được từ các mẫu nước tiểu của người bệnh viêm đường tiết niệu. Vài năm sau, transposon này cũng đã phát hiện trên các loại vi khuẩn gây bệnh như *Salmonella spp.* là loại vi khuẩn lây truyền từ động vật hay *Shigella spp.* là loại vi khuẩn vốn chỉ gây bệnh cho người và không có trên động vật [131]. Các gen kháng các loại KS chỉ dùng trên động vật như apramycin được tìm thấy không chỉ trên động vật mà trong cả hệ vi khuẩn đường ruột của con người, trên các tác nhân lây truyền bệnh động vật sang người như *Salmonella* và trên cả các tác nhân

chỉ gây bệnh trên người như *Shigella*. Rõ ràng là đã có sự truyền gen kháng kháng sinh giữa vi khuẩn gây bệnh trên người và trên động vật [270].

Một số ví dụ khác về sự lan truyền của gen kháng kháng sinh từ động vật sang người là sự lây lan của một số gen như gen kháng apramycin *aacC4* và gen kháng hygromycin *hphB* từ động vật sang vi khuẩn chỉ có ở người. Các loại kháng sinh này chỉ được sử dụng cho động vật, tuy vậy các gen kháng lại được xác định trên cả các chủng vi khuẩn lây truyền từ động vật sang người, các vi khuẩn đường ruột trong môi trường và cả trong hệ vi khuẩn đường ruột của con người trong cộng đồng và trong cả bệnh viện. [79-81, 132, 258].

Nguy cơ lây lan gen kháng kháng sinh sang người không chỉ xuất phát từ các động vật nuôi lấy thịt mà còn từ cả thú nuôi làm cảnh. Nghiên cứu thực hiện năm 2015 tại 1 bệnh viện của Trung Quốc đã phát hiện gen MCR-1 trên 03 chủng *E. coli* phân lập từ bệnh phẩm lâm sàng của 3 người bệnh nhập khoa tiết niệu. Vì một trong 03 người bệnh này làm việc tại cửa hàng thú cưng, nhóm nghiên cứu đã tiến hành lấy 53 mẫu phân từ 39 con chó và 14 con mèo tại cửa hàng này. Người ta đã phát hiện 6 chủng *E. coli* mang gen MCR-1 từ số mẫu thu được bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự. Kỹ thuật MLST và PFGE sau đó được sử dụng và phát hiện sự tương đồng về sequence type giữa 4 chủng *E. coli* mang gen MCR-1 thu được từ chó với chủng thu được từ người bệnh làm việc tại cửa hàng này (ST354). Trong khi đó 2 chủng thu được từ mèo thuộc ST93 và 1 ST mới. Hai chủng thu từ 2 người bệnh còn lại thuộc về 1 ST khác là ST156. Sự tương đồng về ST giữa chủng *E. coli* của người bệnh làm việc tại cửa hàng thú cưng với 04 chủng thu từ các con chó tại cửa hàng gợi ý khả năng lan truyền của *E. coli* mang gen MCR-1 giữa người và thú nuôi. Như vậy thú nuôi làm cảnh cũng có khả năng trở thành nguồn lây lan *E. coli* kháng colistin sang người [301].

Môi trường cũng được coi là ổ chứa quan trọng của vi khuẩn kháng kháng sinh và lây lan sang người và động vật. Hầu hết các hợp chất kháng sinh được sử dụng hiện nay trong y học cho người và thú y là các hợp chất tổng hợp hoặc bán tổng hợp và chúng thường ổn định hơn nhiều và không bị phân hủy sinh học như kháng sinh tự nhiên. Do đó, chúng có thể tồn tại trong môi trường trong một thời gian dài. Hơn nữa, chúng thường có phổ rộng hơn với tác động rộng hơn đến quần thể vi khuẩn. Môi trường tạo thành một ổ chứa kháng thuốc với các sinh vật có thể chia sẻ các gen kháng thuốc [288] và các gen kháng thuốc hoặc vi khuẩn kháng thuốc có thể xâm nhập lây sang người. Sự chuyển giao cũng như sự xuất hiện của

các tổ hợp gen kháng thuốc mới sẽ xảy ra thường xuyên nhất trong các khu vực có mật độ vi khuẩn cao. Xử lý chất thải là nguồn chính của các mầm bệnh kháng kháng sinh xâm nhập vào môi trường. Nhiều chất kháng sinh được sử dụng trong sản xuất thực phẩm cho động vật được hấp thụ rất kém trong ruột của động vật và có tới 90% hợp chất chính được bài tiết qua nước tiểu trở lên đến 75% trong chất thải động vật [119] tồn tại ở đất đai, thường tại chỗ hoặc trong vòng vài dặm của trang trại. Chất thải góp phần làm xuất hiện và lây lan vi khuẩn kháng thuốc vì những lý do sau: a) mầm bệnh kháng thuốc liên quan đến bệnh truyền nhiễm có trong chất thải động vật; b) chất thải có chứa các kháng sinh ổn định; và c) gen lây truyền ngang hoặc các yếu tố quyết định kháng thuốc xảy ra trong môi trường chất thải [56]. Ngoài ra, sự tập trung địa lý của các hoạt động nông nghiệp quy mô lớn có liên quan đến việc ô nhiễm đất và nước tưới cho cây lương thực và với sự hiện diện của vi khuẩn kháng thuốc trong rau quả [150]. Một hiện tượng đáng quan tâm khác là hầu hết các hợp chất dùng trong y học chỉ được người bệnh chuyển hóa một phần và sau đó được thải vào hệ thống nước thải của bệnh viện hoặc cộng đồng. Cùng với phân, chúng chảy theo nước thải đô thị đến nhà máy xử lý nước thải. Chúng có thể đi qua hệ thống nước thải và kết thúc trong môi trường, chủ yếu là trong ngăn chứa nước. Một nghiên cứu nổi bật gần đây đã chứng minh rằng sự lây truyền đang diễn ra giữa quần thể *E. coli* sinh ESBLs ở người bị nhiễm bệnh và bùn thải, rất có thể là do sự xâm nhập của *E. coli* sinh ESBLs từ những người bệnh nhiễm khuẩn tiết niệu vào hệ thống nước thải [298].

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

- Tất cả các người bệnh đến khám tại trạm y tế xã và được xác định mắc 1 trong bốn các bệnh sau: nhiễm khuẩn da, đường tiết niệu, viêm phổi và tiêu chảy (theo định nghĩa ca bệnh) và phù hợp với tiêu chuẩn lựa chọn, tiêu chuẩn loại trừ.
- Tiêu chuẩn lựa chọn: Người bệnh phù hợp với định nghĩa ca bệnh về nhiễm khuẩn đường tiết niệu, nhiễm khuẩn da, viêm phổi, tiêu chảy ở cộng đồng.
- Bố mẹ của người bệnh đối với trẻ em dưới 12 tuổi.
- Tiêu chuẩn loại trừ: Phụ nữ có thai đối với nhiễm khuẩn đường tiết niệu. Người không có đủ năng lực hành vi (người có bất thường về trạng thái tâm thần).

- ***Định nghĩa ca bệnh:***

- Nhiễm khuẩn đường tiết niệu (theo định nghĩa của CDC, Hoa Kỳ): Người bệnh có ít nhất một tiêu chuẩn chính và có thể có một hoặc các tiêu chuẩn phụ sau [72]:
 - *Tiêu chuẩn chính:*
 - ☐ Nước tiểu đục hoặc có máu;
 - ☐ Tiểu dắt
 - ☐ Tiểu đau/buốt/rát
 - ☐ Tiểu khó
 - *Tiêu chuẩn phụ:*
 - ☐ Đau tức vùng hạ vị
 - ☐ Đau tức vùng hông lưng
 - ☐ Sốt
 - ☐ Ốn lạnh
 - ☐ Mệt mỏi
 - ☐ Biếng ăn với trẻ nhỏ
- Nhiễm khuẩn da (theo định nghĩa của CDC, Hoa Kỳ): Người bệnh có nhiễm khuẩn da với tiêu chuẩn chính và ít nhất một tiêu chuẩn phụ sau[72]:
 - *Tiêu chuẩn chính:* Có mủ hoặc dịch trên da
 - *Tiêu chuẩn phụ:*

- ☐ Sung
- ☐ Đỏ
- ☐ Đau
- Tiêu chảy (theo định nghĩa của TCYTTG): người bệnh đi ngoài phân lỏng ≥ 3 lần/ngày, bao gồm tiêu chảy cấp và tiêu chảy mạn tính [14]
- Viêm phổi (theo định nghĩa của CDC, Hoa Kỳ) [73]: có các triệu chứng sau:
 - ☐ Sốt trên 39°C
 - ☐ Rét run
 - ☐ Ho khan lúc đầu, sau có đờm đục
 - ☐ Có thể có đau ngực, khó thở
 - ☐ Nghe phổi có ran

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu:

Thời gian: Thu thập số liệu trong năm 2018- 2019. Tiến hành xét nghiệm và phân tích số liệu 2020-2021.

Địa điểm nghiên cứu: được triển khai tại 8 xã thuộc 8 tỉnh của 3 miền Bắc, Trung và Nam: Hà Nam, Hà Nội, Bắc Ninh, Hải Dương, Thừa Thiên Huế, Khánh Hoà, Bến Tre và Cần Thơ. Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương là nơi phân tích, xét nghiệm mẫu tại phòng Thí nghiệm kháng sinh,

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thiết kế nghiên cứu:

Thiết kế nghiên cứu: mô tả cắt ngang

2.3.2. Cỡ mẫu: Áp dụng công thức tính cỡ mẫu cho một tỷ lệ:

Trong đó:
$$n = Z^2_{(1-\alpha/2)} \frac{1-p}{\varepsilon^2 p}$$

- n: Cỡ mẫu cần thiết cho 1 loại bệnh, cho 1 xã nghiên cứu
- Z: thông số liên quan đến nguy cơ sai số, Z= 1,96 ứng với $\alpha = 0,05$
- ε : độ chính xác tương đối. Lấy $\varepsilon = 0,31$
- p: Tỷ lệ người nhiễm vi khuẩn KKS của **một bệnh nhất định trong cộng đồng**. Chọn p=0,5 (một số kết quả nghiên cứu tại Việt Nam cho thấy tỷ lệ KKS tại cộng đồng ở các loại vi khuẩn trong khoảng 40-60%).

→ $n = 40$

- Ước tính tỷ lệ từ chối 10% → $n = 44$. Như vậy cỡ mẫu tối thiểu cho toàn bộ nghiên cứu trên cộng đồng sẽ là: 44 người x 4 bệnh x 8 xã = 1.408 người bệnh.
- Hệ thống cộng tác viên y tế sẽ được thiết lập để theo dõi phát hiện ca bệnh trong cộng đồng, mời đối tượng đến trạm y tế để phỏng vấn và lấy mẫu nhằm đảm bảo cỡ mẫu cho nghiên cứu.

2.3.3. Chọn mẫu:

Chọn tỉnh: Chọn 08 tỉnh đại diện của 3 miền Bắc, miền Trung và miền Nam, trong đó miền Bắc – 04 tỉnh, miền Trung và miền Nam mỗi miền 2 tỉnh; Chọn tỉnh cụ thể dựa trên cam kết tham gia của tỉnh bao gồm TTYTDP và bệnh viện; dựa trên kinh nghiệm một số tỉnh đã hợp tác triển khai nghiên cứu;

Chọn huyện, xã: Do TTYTDP tỉnh lựa chọn đảm bảo về năng lực thực hiện, tham gia nghiên cứu; dựa trên khảo sát số lượng người dân đến khám trong những năm trước, có các triệu chứng nhiễm khuẩn như của nghiên cứu.

Chọn toàn bộ người đến khám đủ tiêu chuẩn tham gia nghiên cứu cho đến khi đủ theo cỡ mẫu yêu cầu;

2.4. Biến số và chỉ số nghiên cứu:

- Thông tin chung của đối tượng nghiên cứu: Biến số thông tin chung của đối tượng nghiên cứu: Tuổi, giới, nghề nghiệp, trình độ học vấn, tình trạng kinh tế, điều kiện nhà ở, tiền sử sức khỏe.
- Biến số nghiên cứu của mục tiêu số 1:
 - Tỷ lệ vi khuẩn phân lập được, tỷ lệ kháng kháng sinh của *E.coli* và *Klebsiella* spp., số lượng kháng sinh bị kháng, tỷ lệ kháng đa thuốc của *E.coli* và *Klebsiella* spp. - nhạy cảm/kháng/trung gian với các loại KS thử nghiệm; Đặc điểm các gen kháng kháng sinh của vi khuẩn *E.coli* và *Klebsiella* spp.: Tỷ lệ các gen CTX-M, TEM, IMP, NDM; SHV kiểu gen, số lượng gen; Tỷ lệ mang 1 gen kháng, mang đồng gen kháng;

- Một số yếu tố liên quan đến kháng kháng sinh: điều kiện sống, kiến thức về sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh, thực trạng sử dụng kháng sinh cho người và chăn nuôi.
- Biến số của mục tiêu số 2:
 - Kiến thức về sử dụng kháng sinh:
 - Các câu đánh giá kiến thức về kháng kháng sinh: công dụng, triệu chứng, cách thức sử dụng; mức độ nguy hiểm.
 - Kiến thức được đánh giá là đạt nếu tổng số câu đúng nhiều hơn 7/11 câu.
 - Thực trạng sử dụng kháng sinh: tỷ lệ sử dụng kháng sinh, sử dụng theo đơn, mức độ sử dụng kháng sinh, nguồn gốc kháng sinh sử dụng cho người; tỷ lệ sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi, mục đích sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi.
- Biến số của mục tiêu số 3
 - Mối liên hệ về kiểu gen giữa các chủng *E.coli*, *Klebsiella* spp.: Mức độ tương đồng giữa các chủng.
 - Các loại plasmid mang gen kháng kháng sinh của chủng *E.coli*, *Klebsiella* spp.: số lượng, tỷ lệ các loại plasmid, đặc điểm các plasmid.
 - Đặc điểm sequence type của các chủng *E.coli*, *Klebsiella* spp.

2.5. Công cụ và phương pháp thu thập thông tin

2.5.1. Công cụ thu thập thông tin:

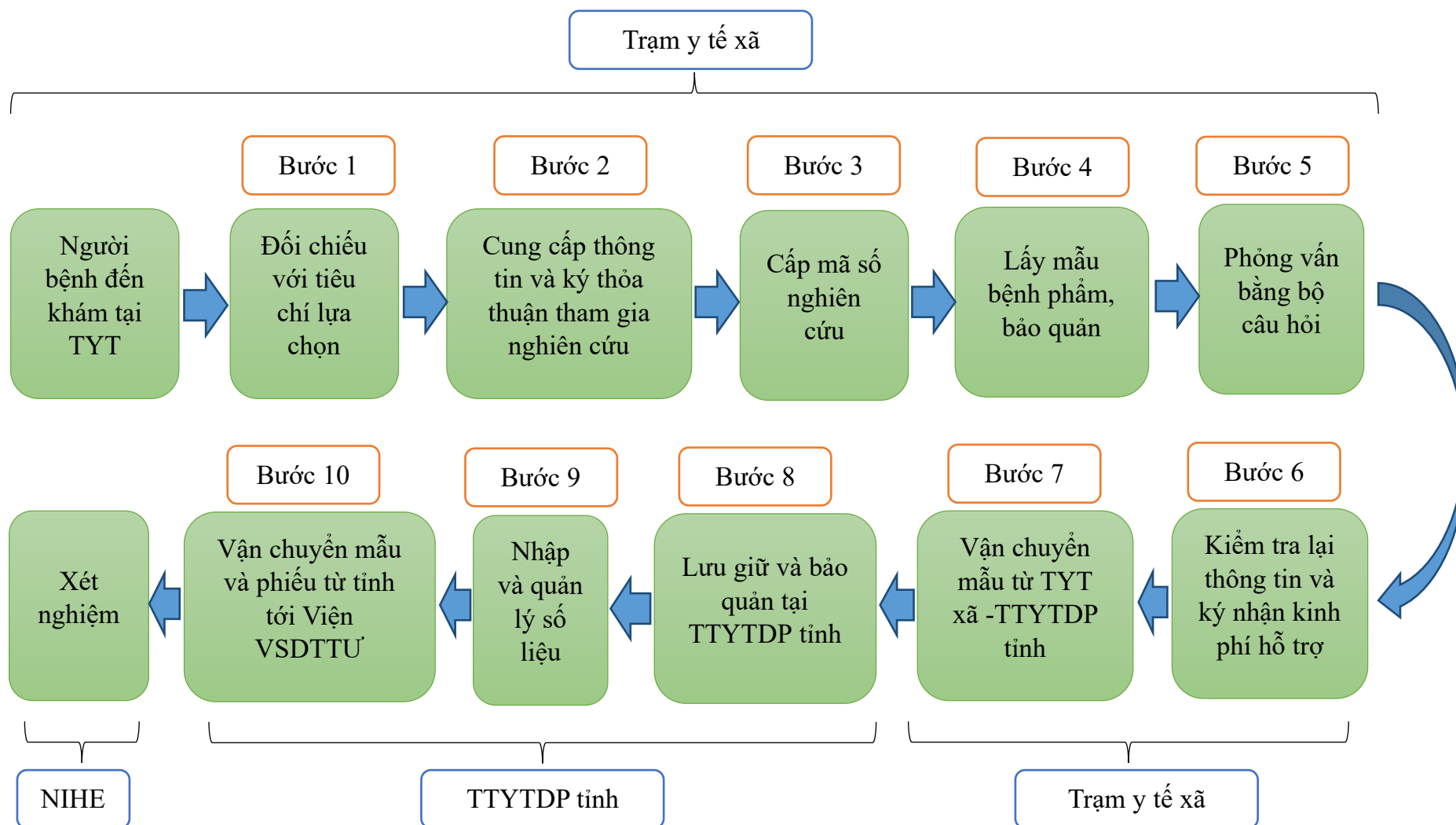
- Bộ câu hỏi phỏng vấn được được nhóm nghiên cứu phát triển dựa trên các **hướng dẫn của TCYTTG và CDC Hoa Kỳ 30** với các câu hỏi cụ thể như bảng 2.1 (Bộ câu hỏi chi tiết tại **Phụ lục số 1**). Bộ câu hỏi được thử nghiệm trên 20 đối tượng nghiên cứu tại tỉnh Hà Nam (được chọn giống như phương pháp chọn mẫu của nghiên cứu) và chỉnh sửa phù hợp trước khi đưa vào nghiên cứu chính thức.

Bảng 2.1: Các câu hỏi đánh giá kiến thức về kháng sinh và kháng kháng sinh và tiêu chí đánh giá

STT	Câu hỏi	Đánh giá đúng
1.	Công dụng của kháng sinh	Điều trị vi khuẩn
2.	Dấu hiệu cần dùng kháng sinh	Nhiễm trùng
3.	Luôn cần kháng sinh trong điều trị bệnh	Sai
4.	Cách sử dụng kháng sinh cho trẻ em	KS riêng biệt/khác người lớn
5.	Chỉ nên sử dụng kháng sinh do bác sĩ kê đơn	Đúng
6.	Mua thuốc kháng sinh tại hiệu thuốc mà không có đơn của bác sĩ	Sai
7.	Có nên dự trữ kháng sinh tại nhà	Sai
8.	Tin tưởng nếu bác sĩ không kê đơn	Có
9.	Có nghe nói về kháng kháng sinh	Có
10.	Mức độ nguy hiểm của kháng kháng sinh	Có
11.	Tác động của sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi tới kháng kháng sinh	Có

Đánh giá: Người tham gia nghiên cứu trả lời đúng từ 7/11 câu hỏi trên được đánh giá là đạt. Đánh giá này được nghiên cứu tham khảo dựa trên nghiên cứu của TCYTTG thực hiện tại một số nước trong khu vực.

- Thu thập các mẫu của người bệnh có các triệu chứng bệnh trên bao gồm mẫu phân, mẫu mủ, mẫu ty hầu và mẫu nước tiểu. Mẫu được thu thập, vận chuyển, bảo quản, xử lý theo quy trình chuẩn của An toàn sinh học để tránh lây nhiễm và sẽ được chuyển về Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. **(Phụ lục số 2)**
- Quy trình tuyển người bệnh nghiên cứu như sau:



Biểu đồ 2.5. Quy trình tuyển người bệnh nghiên cứu

Chi tiết quy trình:

Thực hiện khám, kê đơn cho người bệnh trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

Bước 1: Đối chiếu với tiêu chí lựa chọn đối tượng

Các người bệnh đến khám tại trạm y tế xã được bác sỹ tại TYT xã đối chiếu với tiêu chí lựa chọn như định nghĩa trên:

⇒ Nếu người bệnh **KHÔNG** đáp ứng được tiêu chí lựa chọn, **DỪNG** việc thu tuyển tại đây và tiến hành khám, điều trị cho người bệnh theo thường quy của trạm.

⇒ Nếu người bệnh đáp ứng được tiêu chí trên, chuyển sang **Bước 2**.

Bước 2: Cung cấp thông tin và ký thỏa thuận tham gia nghiên cứu

Sử dụng phiếu cung cấp thông tin và thỏa thuận tham gia nghiên cứu để thảo luận với người bệnh hoặc người giám hộ của người bệnh (nếu người bệnh dưới 18 tuổi hoặc mất năng lực hành vi) một số thông tin cơ bản về nghiên cứu như:

- Mục đích tiến hành nghiên cứu
- Ý nghĩa thực tiễn của nghiên cứu
- Các quyền lợi và nghĩa vụ của người tham gia nghiên cứu
- Bảo mật thông tin
- Các công việc chính sẽ thực hiện:
 - Lấy mẫu: nêu rõ loại mẫu sẽ lấy (dịch tỵ hầu, phân, mủ, nước tiểu)
 - Phỏng vấn bằng Phiếu điều tra thông tin kháng kháng sinh tại cộng đồng (Biểu mẫu KKS-BM02A)

Sau đó,

⇒ Nếu người bệnh hoặc người giám hộ của người bệnh **KHÔNG** đồng ý tham gia vào nghiên cứu, **DỪNG** việc thu tuyển tại đây và tiến hành khám, điều trị cho người bệnh theo thường quy của trạm.

⇒ Nếu người bệnh hoặc người giám hộ của người bệnh đồng ý tham gia vào nghiên cứu, tiến hành ký thỏa thuận tham gia nghiên cứu (Biểu mẫu KKS-BM01A và KKS-BM01B) và chuyển sang **Bước 3**.

Bước 3: Cấp mã số cho đối tượng nghiên cứu

Mã số được cấp theo quy định của nghiên cứu.

Sử dụng “Sổ theo dõi đối tượng tham gia nghiên cứu tại cộng đồng”. Sổ được lưu tại Trạm y tế xã từ khi bắt đầu thu tuyển đến khi đủ 50 người bệnh cho mỗi loại bệnh.

Bước 4: Lấy mẫu, xử lý, bảo quản mẫu

Sau khi cấp mã số, tiến hành lấy mẫu như sau:

Loại bệnh	Loại mẫu
Viêm phổi	Dịch tỵ hầu
Tiêu chảy	Phân
Nhiễm khuẩn da	Mủ
Nhiễm khuẩn tiết niệu	Nước tiểu

Sử dụng Phiếu thu thập mẫu bệnh phẩm tại cộng đồng để ghi chép lại thông tin cho từng mẫu thu được. Phiếu thu thập thông tin bệnh phẩm sẽ được gửi kèm theo mẫu tới phòng xét nghiệm tại TTYTDP tỉnh.

Bước 5: Phỏng vấn bằng bộ câu hỏi

Sử dụng Phiếu điều tra thông tin kháng kháng sinh tại cộng đồng.

2.5.2. Các kỹ thuật xét nghiệm áp dụng

Các kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm Kháng kháng sinh của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, cụ thể được tóm tắt trong bảng 2.2. Chi tiết các kỹ thuật xét nghiệm được miêu tả tại **Phụ lục số 3**.

Bảng 2.2. Các hoạt động thực hiện tại phòng thí nghiệm

Các hoạt động thực hiện	Kỹ thuật chính
Lựa chọn toàn bộ chủng <i>E.coli</i> và <i>Klebsiella</i> spp. phân lập được và thông tin nhân khẩu học và các thông tin liên quan của chủng	
Nuôi cấy phân lập, định danh	Nuôi cấy, phân lập dựa vào đặc điểm sinh vật, hoá học
Định danh các loại vi khuẩn	Máy Maditof
Phát hiện các gen mã hóa sinh ESBLs và gen mã hoá carbapenemase của các chủng <i>E. coli</i> và <i>Klebsiella</i> spp. bằng kỹ thuật PCR đa môi	Phản ứng PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu
Lựa chọn các chủng vi khuẩn <i>E.coli</i> và <i>Klebsiella</i> spp. xác định nồng độ kháng sinh tối thiểu ức chế vi khuẩn	MIC
Lựa chọn một số <i>E.coli</i> và <i>Klebsiella</i> spp. mang gen mã hoá sinh ESBLs và carbapenemase phân tích mối liên hệ về kiểu gen	Giải trình tự toàn bộ hệ gen (WGS)

2.5.2.1 Các trang thiết bị và hoá chất sử dụng cho nghiên cứu

Trang thiết bị dụng cụ

- Máy PCR model ABI9700 (Hãng sản xuất ABI – Mỹ)
- Bể ủ nhiệt nước Memmert (Đức), máy ủ nhiệt khô
- Máy định danh vi khuẩn Maldi-tof (Brucker- Đức)
- Máy đo pH (Oakton – Eutech)
- Máy chụp ảnh gel
- Tủ an toàn sinh học cấp 2 Esco.
- Máy giải trình tự gen Miseq System, Model SY-410-108 (Hãng Illumina – Mỹ)
- Tủ ấm 37⁰C Memmert
- Máy ly tâm tốc độ cao Eppendorf
- Bộ điện di Imupid
- Máy đo Qubit
- Giá từ

Hóa chất, sinh phẩm

Hóa chất sinh phẩm dùng cho nuôi cấy phân lập và nồng độ KS tối thiểu ức chế vi khuẩn

- Môi trường không chọn lọc: Thạch TSA (Hãng BD – Mỹ)
- Môi trường chọn lọc Macconkey (Hãng Oxoid – Mỹ)
- Thạch Muller Hilton (Hãng BD – Mỹ)
- Các loại KS Ampicillin (AMP), Amoxicillin Acid clavulanic (AXM), Cefotaxime (CTX), Ceftazidime (CAZ), Ciprofloxacin (CIP), Sulfamethoxazol-Trimethoprim (SXT), Meropenem (MEM), Gentamicin (GEN), Amikacin (AMK), SIGMA, Mỹ.

Hoá chất dùng định danh bằng Mauditof

- Bruker Bacterial Test Standard (BTS),
- Axit formic tinh khiết 99-100%,
- Acetonitrile tinh khiết 99-100%, A
- Axit trifluoroacetic (TFA) tinh khiết 99-100%,
- Ethanol tinh khiết 99-100%, Nước tinh khiết
- IVD matrix HCCA-portioned

Hóa chất sinh phẩm dùng cho PCR

- 2X Go-taq Master-Mix (GoTaq® ADN Polymerase, Promega)

- Các cặp mồi phát hiện gen mã hoá gen mã hoá sinh ESBLs và carbapenemase (Bảng 2.3)
- Thang chuẩn ADN: 100bp, 1kb
- Thạch điện di,
- Dung dịch đệm chạy điện di: TBE 0.5X

Bảng 2.3. Trình tự mồi cho phản ứng PCR đa mồi xác định gen mã hoá ESBLs và carbapenemase

Gen	Tên mồi	Kích thước mồi	Trình tự (5' - 3')
<i>TEM</i>	F	372bp	GGTCGCCGCATACACTATTCTC
	R		TTTATCCGCCTCCATCCAGTC
<i>SHV</i>	F	231bp	CCAGCAGGATCTGGTGGACTAC
	R		CCGGGAAGCGCCTCAT
<i>CTX-M-1</i>	F	588bp	GAATTAGAGCGGCAGTCGGG
	R		CACAACCCAGGAAGCAGGC
<i>NDM-1</i>	F	492bp	TTCGACCCAGCCA TTGGCGGCGA
	R		A TGCACCCGGTCGCGAAGCTGAG
<i>KPC</i>	F	881bp	ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT
	R		TTA CTG CCC GTT GAC GCC CA
<i>IMP-1</i>	F	713bp	AGC AAG TTA TCT GTA TTC TT
	R		AGC AAG TTA TCT GTA TTC TT

Hóa chất sinh phẩm dùng cho giải trình tự toàn bộ hệ gen vi khuẩn

Bảng 2.4. Các hóa chất dùng cho giải trình tự toàn bộ hệ gen vi khuẩn

Hóa chất	Hãng/mã số
AMPure XP bead	Beckman Courter - A63882
Nextera XT ADN samples preparation kit 24 sample	Illumina/USA FC-131-1024
Nextera XT index kit (24 indicate)	Illumina/USA FC-131-1001
MiSeq reagent kit 300V2	Illumina/USA MS-102-2002
Qubit Assay kit dsADN HS	Invitrogen- Q32851
Qubit Assay tubes	Invitrogen- Q32856
H ₂ O dùng cho sinh học phân tử	Sigma – W4502
Đệm TE dùng cho sinh học phân tử	Sigma - T9285
Cồn tuyệt đối	Merk
Ống PCR 0.2ml, ống tube 1.5mL	Applied Biosystems- 4323032
Dung dịch NaOH	Sigma

2.5.2.2 Các kỹ thuật chính trong phòng thí nghiệm được sử dụng trong nghiên cứu.

2.5.2.2.1 Kỹ thuật nuôi cấy, phân lập

Các mẫu bệnh phẩm sau khi thu thập được cấy lên đĩa thạch MacConkey (Oxoid, Anh), Chapman ở 37°C trong 18-24 giờ. Lựa chọn các khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch để xác định các chủng vi khuẩn. Chi tiết kỹ thuật nuôi cấy theo Quy trình chuẩn của Phòng thí nghiệm KS, khoa Vi khuẩn. Sau đó chọn các khuẩn lạc thuần.

2.5.2.2.2. Định danh các loại vi khuẩn bằng máy định danh MALDI

Biotyper

Khuẩn lạc thuần của mẫu bệnh phẩm được chọn được định danh bằng máy định danh MALDI Biotyper

- Phết mỗi mẫu khuẩn lạc thuần lên một vị trí (spot) của đĩa MALDI target. Lưu ý chỉ phết một lượng nhỏ khuẩn lạc vừa đủ (xem hình minh họa phía dưới), có thể sử dụng tăm tiết trùng để phết.
- Bỏ sung 1 µL dung dịch acid formic 70% lên vị trí có mẫu, để khô ở nhiệt độ phòng.
- Cho 1 µL dung dịch HCCA Matrix lên mỗi vị trí mẫu và để khô ở nhiệt độ phòng, sau đó có thể đưa đĩa MALDI Target vào máy MALDI Biotyper để thực hiện định danh.
- Đưa đĩa mẫu Target vào máy và chạy

2.5.2.2.3 Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) phát hiện gen kháng kháng sinh.

Nếu cho kết quả là 1 trong 2 loại vi khuẩn: *E. coli*, *Klebsiella* spp. thì tiếp tục cấy thuần khuẩn lạc, tách ADN để chạy phản ứng PCR phát hiện gen kháng kháng sinh và lưu giữ chủng ở nhiệt độ -80°C cho các kỹ thuật xét nghiệm khác. Kỹ thuật này được thực hiện theo phương pháp đã sử dụng trong nghiên cứu của Trần Như Dương và Trần Huy Hoàng và Lê Quốc Phong [13]

- **Tách ADN bằng phương pháp nhiệt:** Dùng que cấy vô trùng lấy vi khuẩn, hòa tan trong 200µl đệm TE 1X. Ủ nhiệt khô 95°C trong 15 phút. Ly tâm 14.000 vòng/2 phút. Lấy nước nổi làm ADN khuôn mẫu. ADN có thể sử dụng ngay hoặc bảo quản ở -20°C.

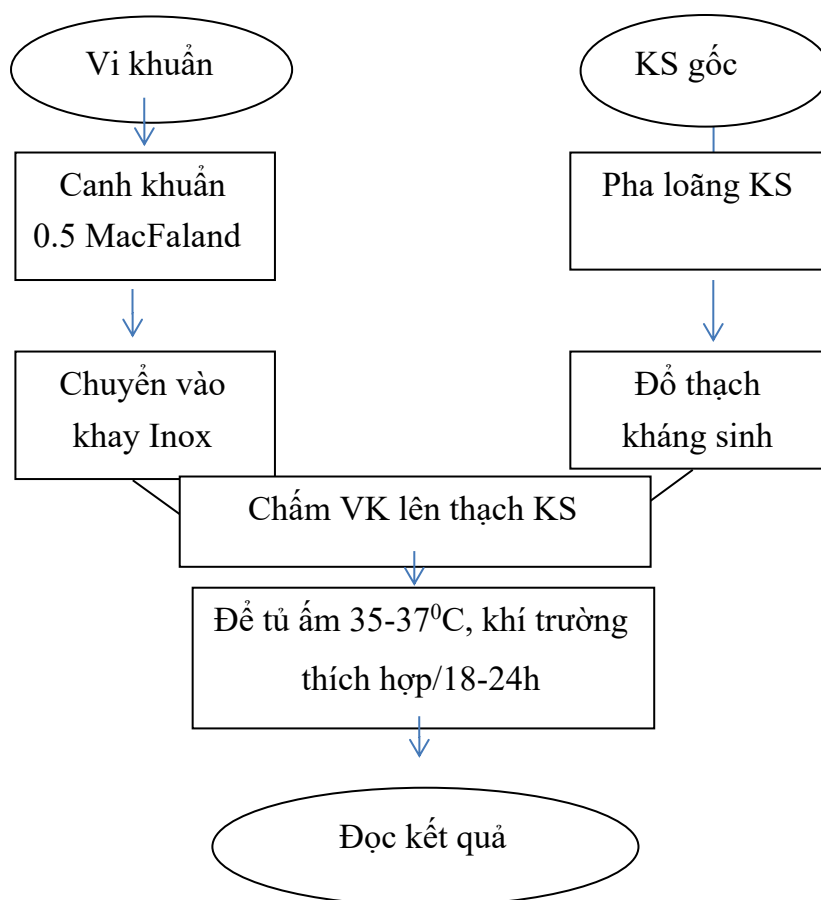
- **Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR:** Lấy các thành phần của hỗn hợp phản ứng PCR từ -20°C ra, để vào khay lạnh hoặc để ở ngăn mát tủ lạnh hoặc hộp đá vụn đến khi tan hoàn toàn, trộn đều bằng cách búng nhẹ vào đáy tube và ly tâm ngắn trước khi mở nắp. Khi sử dụng trộn đều các thành phần 2 – 3 lần bằng pipet. Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR tương ứng với số mẫu cần làm gồm các thành phần theo bảng 2.5, trộn đều, ly tâm ngắn sau đó chia 18 μl hỗn hợp phản ứng PCR vào các tube PCR 0.2ml.
- **Thành phần phản ứng PCR**

Bảng 2.1. Các thành phần phản ứng PCR

Thành phần phản ứng	1 mẫu (μl)
PCR Master Mix 2x	10
Mồi xuôi 10 μM	0.5
Mồi ngược 10 μM	0.5
Nước siêu sạch	8

- **Bổ sung ADN mẫu và chạy phản ứng PCR:** Tra 2 μL ADN mẫu vào hỗn hợp phản ứng PCR được tiến hành trong tủ an toàn sinh học cấp 2 chuyên dùng để tra ADN. Hỗn hợp thành phần phản ứng PCR sau khi bổ sung ADN mẫu được ly tâm ngắn trước khi đưa vào máy PCR với chu trình nhiệt: 94°C (5 phút), 35 chu kỳ: 94°C (30 giây), 60°C (90 giây), 72°C (90 giây), 72°C (3 phút), giữ 15°C . Điện di sản phẩm PCR trên thạch Agarose nồng độ 1,5% có bổ sung chất nhuộm Redsafe (3 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ thạch), điện trường 100V trong thời gian 30 phút.
- **Phân tích kết quả PCR:** Phản ứng PCR có giá trị khi mẫu chứng âm (sử dụng nước cất tinh sạch) không xuất hiện vạch đồng thời mẫu chứng dương có vạch tương ứng với kích thước gen khi so sánh với thang chuẩn 1000kb. Chứng dương là mẫu ADN có chứa các gen đích của chủng vi khuẩn được phân lập tại PTN KS, Khoa Vi khuẩn Viện VSDT TƯ đã được kiểm tra và xác nhận bởi TS Keygo Shibayama và cộng sự, khoa Vi khuẩn I, Viện Truyền nhiễm quốc gia Tokyo, Nhật Bản nhận. Các mẫu có xuất hiện băng cùng kích thước với chứng dương được xác định là chủng có mang gen độc tố, các mẫu không có vạch hoặc lên vạch không đúng kích thước với chứng dương được coi là âm tính.

2.5.2.2.4 Kỹ thuật đánh giá nồng độ KS tối thiểu ức chế vi khuẩn (MIC)



Biểu đồ 2.5. Kỹ thuật xác định nồng độ KS tối thiểu ức chế vi khuẩn (MIC)

Đánh giá nồng độ kháng sinh ức chế tối thiểu bằng kỹ thuật pha loãng trong thạch với các kháng sinh Ampicillin (AMP), Amoxicillin + acid clavulanic (AMX), Cefotaxime (CTX), Ceftazidime (CAZ), Ciprofloxacin (CIP), Sulfamethoxazol + Trimethoprim (SXT), Meropenem (MEM), Gentamicin (GEN), Amikacin (AMK).

Pha nồng độ kháng sinh gốc

- Chuẩn bị sẵn các dụng cụ cân và hòa tan kháng sinh: thìa cân kháng sinh, thuyền cân kháng sinh, tube Falcon 15ml vô trùng ...
- Tính toán khối lượng kháng sinh cần cân theo công thức
- Cân lượng kháng sinh như tính toán, đổ vào ống (tube) vô trùng, ghi tên kháng sinh, nồng độ, ngày pha lên phần thân ống.
- Hòa tan kháng sinh bằng dung môi hòa tan, thể tích dung môi tối đa bằng 1/10 thể tích cần pha. Lắc kỹ để hòa tan hoàn toàn kháng sinh.
- Bổ sung phần thể tích còn lại bằng dung môi pha loãng kháng sinh. Nếu dung môi hòa tan và dung môi pha loãng cùng là nước thì đầu tiên cho một

phần thể tích cần pha, lắc cho kháng sinh tan hoàn toàn mới bồi phụ đủ thể tích.

Pha về nồng độ kháng sinh cần sử dụng:

- Dùng KS nồng độ gốc pha loãng để được kháng sinh nồng độ đầu trong bậc pha loãng.
- Từ nồng độ đầu, pha loãng bậc 2 để được các bậc nồng độ kháng sinh trung gian đến nồng độ thấp nhất cần dùng. Ở các bậc pha loãng, trộn đều kháng sinh bằng cách trộn lên xuống ít nhất 10 lần, sau đó nhả hết dung dịch trong pipet ra, rồi hút dung dịch để chuyển sang bước tiếp theo

Đổ thạch kháng sinh

- Ghi tên kháng sinh và nồng độ viết tắt lên nắp đĩa petri theo thứ tự từ bậc 1 đến bậc cuối cùng.
- Chuyển 2,5ml kháng sinh nồng độ sang đĩa petri vô trùng đã được đánh số nồng độ và tên kháng sinh tương ứng
- Cân khối lượng thạch Mueller-Hinton Agar theo hướng dẫn của nhà sản xuất, hòa tan trong nước cất. Đun sôi để hòa tan hoàn toàn thạch. Tiệt trùng ưôt ở 121°C/15 phút hoặc theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Bảo quản các bình môi trường trong các bể ủ nhiệt ở 45 – 50°C đến khi sử dụng để tránh thạch bị đông trong quá trình đổ.
- Dùng pipet điện hút 22,5ml thạch vào đĩa thạch đã có sẵn 2,5ml KS, lắc đĩa xoay tròn đều 20 - 30 lần để hòa tan đều kháng sinh trong thạch. Đậy nắp đĩa thạch, để 15 phút đến khi thạch đông, có thể xếp chồng lên nhau.
- Đĩa thạch có kháng sinh sau khi pha có thể bảo quản ở 40°C (trừ đĩa thạch có chứa Imipenem hoặc clavulanate) hoặc để ở nhiệt độ phòng không quá 25°C qua đêm, ngày hôm sau sử dụng.
- Chuẩn bị một số đĩa thạch Mueller-Hinton không có kháng sinh (25mL/đĩa) để làm đĩa chứng.

Chuẩn bị vi khuẩn

- Cấy riêng rẽ các chủng nghiên cứu, chủng *E. coli* ATCC 25922 trên môi trường không chọn lọc, ủ 37°C từ 18-24h. Đảm bảo các chủng vi khuẩn trước khi làm thí nghiệm luôn phải thuần và tươi mới.

- Pha canh khuẩn:

+ Dùng que cấy vô trùng lấy 1 khuẩn lạc của các chủng đã nuôi cấy hòa tan vào 2 ml nước muối sinh lý vô trùng và trộn đều bằng máy lắc vortex. Độ đục của huyền dịch vi khuẩn sẽ được so sánh với độ đục chuẩn 0,5 của thang McFarland tương đương với nồng độ 10^8 vi khuẩn/mL.

+ Pha loãng 100 lần huyền dịch vi khuẩn bằng cách lấy 20 μ L huyền dịch vừa pha vào 2 mL nước muối sinh lý vô trùng để thu được huyền dịch vi khuẩn có nồng độ 10^6 vi khuẩn/mL

- Sắp xếp các ống canh khuẩn theo sơ đồ tương tự với sơ đồ của khay inox 32 giếng. Hút 300 μ L canh khuẩn có nồng độ 10^6 vào các giếng trên khay inox theo sơ đồ.

	1	2	3	4	
5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22
23	24	25	26	27	28
	29	30	31	32	

Cấy vi khuẩn (Chấm vi khuẩn):

- Dùng bộ cấy vi khuẩn 32 chân đặt vào các giếng của khay inox. Nhấc nhẹ nhàng bộ cấy 32 chân lên và đặt xuống bề mặt đĩa thạch (không để chân dính sâu vào thạch) và chính xác (chỉ đặt 1 lần, không di chuyển)
- Chấm lên đĩa không có kháng sinh trước, sau đó tiếp tục chấm và đặt lên các đĩa thạch có kháng sinh từ nồng độ thấp đến nồng độ cao
- Cuối cùng, chấm vào đĩa thạch không có kháng sinh một lần nữa để làm chứng
- Các đĩa thạch được để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó ủ 37°C trong vòng 18-24 giờ.

Đọc kết quả và biện luận

- Đảm bảo chất lượng xét nghiệm: tất cả các chủng mọc tốt ở 2 đĩa đầu và

cuối (không chứa kháng sinh); nồng độ kháng sinh tối thiểu ức chế sự phát triển của 2 chủng chuẩn nằm trong khoảng cho phép theo tiêu chuẩn CLSI (2018) với các loại kháng sinh kể trên.

- Kết quả MIC được đọc từ nồng độ kháng sinh thấp đến nồng độ cao.
- Ở nồng độ vi khuẩn có nồng độ tương đương 105 thì đọc là dương, ghi dấu (+). Ở nồng độ mà lượng vi khuẩn giảm rõ rệt cả về kích thước và/hoặc số lượng khuẩn lạc so với đĩa chứng, đọc kết quả cộng trừ, ghi dấu (+/-). Ở nồng độ không còn ghi nhận sự vi khuẩn hoặc chỉ còn 1-3 khuẩn lạc mọc đọc là âm, ghi dấu (-). Kết quả kháng sinh đồ của chủng thử nghiệm được so sánh với các giá trị điểm gãy trong tài liệu CLSI 2020 để nhận định là nhạy cảm (S), đề kháng trung gian (I) hay đề kháng (R).
- Đa kháng thuốc là vi khuẩn kháng với từ 3 nhóm kháng sinh được thử nghiệm trở lên.

2.5.2.2.5 Kỹ thuật giải trình tự gen

Kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen của chủng E.coli và Klebsiella spp.

- Lựa chọn các chủng *E. coli* và *Klebsiella* spp. đã được xác định có mang gen mã hoá nhóm carbapenemase và ESBLs để giải trình tự toàn bộ hệ gen của vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB ở 37°C từ 18- 24 giờ.
- Tách ADN bằng hệ thống tách chiết tự động QIAcube (Qiagen, Mỹ).
- Định lượng ADN bằng kit và máy đo nồng độ Qubit
- Thiết lập thư viện ADN sử dụng kit NexteraXT (Illumina, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Giải trình tự các gen bằng máy MiSeq (Illumina, Mỹ) dùng kit MiSeq Reagent V3 Kit; 2x 300 chu kỳ).

Quy trình giải trình tự toàn bộ hệ gen

Bước 1: Chuẩn bị ADN của vi khuẩn

- Các chủng vi khuẩn được lựa chọn làm giải trình tự toàn bộ hệ gen được cấy trên môi trường thạch không chọn lọc.
- Tách ADN của vi khuẩn bằng kit QIAamp ADN Mini Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất
- Định lượng ADN thu được bằng máy đo nồng độ Qubit:
 - Pha hóa chất Qubit Working Solution theo tỷ lệ 1 ul Qubit reagent: 199 ul Qubit Buffer.

- Pha hỗn hợp dung dịch đo nồng độ ADN trong các ống đo chuyên dụng theo các bước như sau:
- Standard: 10 ul standard (S1/S2) trong 190 ul Qubit working solution
- Mẫu cần đo nồng độ ADN: 2 ul mẫu trong 198 ul Qubit working solution.
- Đưa standard và mẫu vào máy Qubit và đo nồng độ ADN.
- Hòa trộn các sản phẩm PCR theo nồng độ đồng đều.
- Pha loãng mẫu ADN về nồng độ 0.2 ng/ μ L

Bước 2: Chuẩn bị thư viện

♦ Tagmentation: Cắt ADN thành những đoạn ngắn

- Rã đông các ống ATM (Amplicon Tagment Mix), TD (Tagment ADN Buffer), và các mẫu ADN, giữ trong khay đá.
- Làm ấm ống NT (Neutralize Tagment Buffer) đến nhiệt độ phòng.
- Sau khi rã đông, nhẹ nhàng đảo ngược các ống hóa chất 3-5 lần để trộn đều.
- Chuẩn bị NTA (Nextera XT Tagment Amplicon). Mục đích: kích hoạt enzyme ở nhiệt độ 55°C để cắt ADN thành những đoạn có kích thước khoảng 300 bp.
- Ký hiệu ống PCR mới là NTA.
- Cho 10 ul dung dịch đệm TD vào mỗi ống, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Cho 5 ul hỗn hợp ADN của từng mẫu (đã pha loãng đến nồng độ 0,2 ng / ml) vào mỗi ống NTA riêng biệt.
- Thêm 5 ul ATM vào các ống, hút nhả pipet 5 lần, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác,
- Đậy nắp các ống và ly tâm ở 280 xg ở 20 ° C trong 1 phút để đảm bảo các hóa chất được tập trung ở phần đáy ống
- Đưa các ống NTA vào máy PCR và chạy chương trình sau để kích hoạt enzyme: 55°C: 5 min; Hold: 10 ° C
- Ngay sau khi đạt đến 10°C, chuyển ngay sang bước tiếp theo.
- Vô hiệu hóa enzyme trong các ống NTA. Mục đích: vô hiệu hóa enzyme cắt, loại bỏ nguy cơ ADN sẽ tiếp tục bị phân cắt ở các bước tiếp theo
- Cẩn thận mở nắp các ống NTA và thêm 5 ul đệm NT vào từng ống để vô hiệu hóa enzyme, hút nhả pipet 5 lần để trộn đều, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Đậy nắp và ly tâm ở 280 xg ở 20 ° C trong 1 phút.
- Ủ các ống NTA ở nhiệt độ phòng trong 5 phút để đảm bảo enzyme bị bất hoạt hoàn toàn

♦ **PCR gắn index:**

- Rã đông hóa chất NPM (Nextera PCR Master Mix) và các index ở nhiệt độ phòng trong khoảng 20 phút, nhẹ nhàng đảo thuận nghịch các ống 3-5 lần.
- Do index được gắn vào 2 đầu các sợi đơn ADN, Theo bộ kit 96 index, sắp xếp các ống index trên đĩa TruSeq Index Plate Fixture như sau:
- Sắp xếp các index 1 (mỗi I7 có nắp màu cam) để theo chiều ngang,
- Sắp xếp các index 2 (mỗi I5 có nắp trắng) theo thứ tự theo chiều dọc
- Thêm 15 µl NPM vào từng ống mẫu, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Thêm 5 µl index 2 (nắp trắng) vào từng ống theo cột, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác. Thêm 5 µl index 1 (nắp màu cam) vào từng ống theo hàng, hút nhả pipet 5 lần, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Để tránh nhiễm chéo, loại bỏ tất cả các nắp đã dùng và thay bằng nắp mới được cung cấp theo bộ kit.
- Đậy nắp các ống và ly tâm ở 1000 xg ở 20 ° C trong 1 phút, để đảm bảo các hóa chất tập trung dưới đáy ống.
- Thành phần phản ứng như sau:

Thành phần	Thể tích
ADN sau khi targmentation	25 µl
Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)	5 µl
Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)	5 µl
NPM	15 µl
Tổng số	50 l

- Tiến hành phản ứng PCR để gắn index theo chu trình nhiệt sau:
 - 2°C: 3 phút
 - 95°C: 30 giây
 - cycles: 95°C: 10 giây; 55°C: 30 giây; 72°C: 30 giây
 - 72°C: 5 phút
 - 10°C: ∞

♦ **Tinh sạch sản phẩm PCR**

- Vortex AMPure XP trong 30 giây, sử dụng pipet, thêm 90 µl AMPure XP vào từng mẫu, hút nhả pipet 10 lần đảm bảo các hạt bead được hoàn toàn trộn đều.

- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút để ADN bám vào các hạt bead.
- Đặt ống trên giá từ trong 2 phút, để đảm bảo lực từ giữ chặt hạt bead cùng với ADN bám trên đó.
- Sử dụng pipet hút toàn bộ dịch nổi trong ống, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Giữ nguyên plate trên giá từ, tiến hành các bước rửa với ethanol 80% như sau:
- Thêm 200 μ l ethanol 80% vào các ống. Để trong 30 giây. Cẩn thận loại bỏ dịch nổi.
- Giữ nguyên plate trên giá từ, lặp lại bước rửa trên 1 lần nữa.
- Giữ nguyên plate trên giá từ, để khô tự nhiên trong 10-15 phút.
- Nhấc plate khỏi giá từ, Dùng pipet thêm 52,5 μ l RSB (Resuspension Buffer) vào từng ống mẫu, hút nhả pipet 10 lần, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác, bước này nhằm mục đích thổi ADN ra khỏi hạt bead.
- Để ở nhiệt độ phòng trong 2 phút, để đảm bảo ADN được thổi hết ra khỏi hạt bead.
- Đặt các ống lên giá từ trong 2 phút, để lực từ hút hết các hạt bead xuống dưới, lúc này phần dịch nổi là phần có chứa ADN.
- Ký hiệu một plate mới
- Dùng pipet, cẩn thận chuyển 50 μ l dịch nổi từ plate cũ sang plate mới, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.

♦ Đồng đều hóa nồng độ mẫu

- Lặp lại quá trình đo Qubit, sử dụng ADN vừa thu được ở bước trên.
- Các mẫu ADN sau khi tinh sạch được kiểm tra kích thước trung bình bằng cách điện di trên thạch Agarose 1% có bổ sung Redsafe theo tỷ lệ 5 μ L Redsafe/100mL thạch. 5 μ L mẫu ADN trộn đều với 1 μ L Loading Dye 6X và tra toàn bộ hỗn hợp này vào giếng, điện di trong thời gian 1 giờ với điện trường là 50V.
- Tính toán nồng độ của ADN sang nM dựa trên kích thước ADN theo công thức như sau:

$$\frac{(\text{concentration in ng}/\mu\text{l})}{(660 \text{ g/mol} \times \text{average library size})} \times 10^6 = \text{concentration in nM}$$

For example:

$$\frac{15 \text{ ng}/\mu\text{l}}{(660 \text{ g/mol} \times 500)} \times 10^6 = 45 \text{ nM}$$

- Rã đông ống LNA1 (Library Normalization Additives 1) đến nhiệt độ phòng, bằng cách ngâm trong bể nước có nhiệt độ 20 đến 25°C. Làm ấm ống LNB1 (Library Normalization Beads 1) và LNW1 (Library Normalization Wash 1) ở nhiệt độ phòng, bằng cách ngâm trong bể nước có nhiệt độ 20 đến 25°C.
- Vortex LNB1 trong ít nhất 1 phút và đảo nghịch liên tục khoảng 15 đến 20 lần
- Làm ấm ống LNS1 (Library Normalization Storage Buffer 1) về nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.
- Đánh dấu một plate 96 sạch
- Cẩn thận chuyển 20 μ l dịch nổi từ sản phẩm PCR tinh sạch, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Hút 1,1 ml LNA1 (hóa chất xúc tác ADN bám vào hạt bead) vào 1 ống Eppendorf 1.5 ml.
- Dùng pipet 1000, hút nhả pipet trong ống LNB1 20 lần để trộn đều hạt bead.
- Hút 200 μ l LNB1 vào ống Eppendorf chứa sẵn LNA1, trộn đều bằng cách đảo ngược ống 20 lần.
- Hút 45 μ l hỗn hợp LNA1/LNB1 vào mỗi ống LNP đã chứa sẵn mẫu.
- Đóng chặt nắp các ống LNP, và lắc các ống LNP trên tại vận tốc 1.800 rpm trong 30 phút để đảm bảo các sợi ADN bám vào hạt bead với mật độ đồng đều.
- Để các ống trên giá từ trong 2 phút để lực từ hút các hạt bead có gắn ADN xuống đáy ống. Giữ nguyên các ống LNP trên giá từ, vận pipet đến 80 μ l, cẩn thận loại bỏ dịch nổi.
- Nhấc các ống LNP ra khỏi giá từ và tiến hành bước rửa với LNW1 như sau: Thêm 45 μ l LNW1 mỗi ống. Đóng chặt nắp các ống. Lắc với vận tốc 1.800 rpm trong 5 phút. Đặt các ống trên giá từ trong 2 phút. Cẩn thận loại bỏ dịch nổi, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Nhấc các ống LNP ra khỏi giá từ và tiến hành lặp lại bước rửa lần 2 với LNW1 giống với lần 1
- Nhấc các ống LNP khỏi giá từ, thêm 30 μ l NaOH 0,2 N vào các ống để thôi mẫu.
- Đóng chặt nắp và lắc ống LNP tại vận tốc 1.800 rpm trong 5 phút để đảm bảo ADN bị thôi hết khỏi hạt bead.
- Trong khi lắc, chuẩn bị ống SGP (StoraGe Plate) (là ống PCR)
- Cho 30 μ l hóa chất bảo quản ADN LNS1 vào mỗi ống SGP.

- Sau 5 phút lắc, kiểm tra, đảm bảo tất cả các mẫu trong tấm LNP đã trộn đều hoàn toàn. Nếu thấy các mẫu không trộn đều hoàn toàn, nhẹ nhàng hút nhả pipet 3 đến 5 lần, lắc thêm trong 5 phút nữa.
- Đặt các ống LNP trên giá từ trong 2 phút để hút toàn bộ hạt bead xuống đáy ống.
- Thiết lập pipet đến 30 ul, chuyển dịch nổi chứa ADN từ ống LNP sang ống SGP, thay đầu côn sau mỗi lần thao tác.
- Đậy chặt nắp ống, ly tâm ở 1.000 xg trong 1 phút.

♦ **Gộp mẫu và đưa mẫu vào máy Miseq**

- Ly tâm ống SGP tại 1000xg trong vòng 1 phút ở 20oC đảm bảo ADN tập trung ở phần dung dịch đáy ống.
- Ký hiệu ống PAL (Pool Amplicon Library).
- Chuyển 12 ul của mỗi mẫu trong ống SGP sang ống PAL
- Ký hiệu ống DAL mới (Dilluted Amplicon Library)
- Thêm 588 ul hóa chất hỗ trợ cho các sợi ADN bám vào flowcell HT1 vào ống Dal.
- Chuyển 24 ul hỗn hợp ADN từ Pal sang DAL có chứa HT1. Sử dụng cùng đầu côn mix đều 3-5 lần.
- Vortex ống DAL với tốc độ cao nhất.
- Đưa ống DAL vào block nhiệt ở 96 oC, ủ trong 2 phút để đảm bảo các sợi đơn ADN biến tính hoàn toàn thành mạch đơn ADN.
- Sau khi ủ, đảo ngược ống DAL 1-2 lần để pha trộn và đặt vào box nước đá ngay lập tức trong vòng 5 phút.
- Đưa toàn bộ hỗn hợp trong hộp DAL vào khay Miseq Reagent Cartridge theo vị trí load Samples trên khay.

Bước 3: Chạy máy giải trình tự Illumina-Miseq

2.5.3. Phương pháp Xử lý và phân tích số liệu:

- Số liệu được quản lý bằng phần mềm Epidata 3.1, được xử lý và phân tích bằng phần mềm STATA.
- Các thông số về tần suất, tỷ lệ, trung bình, độ lệch chuẩn... được sử dụng để mô tả các đặc điểm đối tượng nghiên cứu, đặc điểm phân bố của vi khuẩn kháng kháng sinh...
- Các kiểm định thống kê được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa các kết quả như t-test và ANOVA đối với biến định lượng, Fisher's exact test và Chi-square

đối với biến định tính. Hồi quy logistics được sử dụng để đánh giá mối tương quan giữa các biến.

- Số liệu về các chủng vi khuẩn được quản lý bằng phần mềm Excel. Kết quả được trình bày dưới dạng bảng, biểu đồ.
- Sử dụng công cụ tìm kiếm trình tự tương đồng cơ bản (Basic Local Alignment Search Tool – BLAST) để đối chiếu kết quả giải trình tự gen với trình tự gen đích trên cơ sở dữ liệu của NCBI và công cụ ResFinder phiên bản 2.1 để xác định các biến thể của gen kháng. Yêu cầu kết quả phải cho độ tương đồng > 95%.
- Kết quả MLST được phân tích sử dụng phần mềm Bionumeric 6.6.11 (Applied Math) để thể hiện thành dạng cây phả hệ. Các chủng sẽ được xem là thuộc cùng 1 nhóm nếu có độ tương đồng từ 80% trở lên.
- Cây phân loại kiểu gen được thiết lập trên cơ sở phân hệ gen tương đồng giữa các chủng vi khuẩn (core genome) (thường là hệ gen trên nhiễm sắc thể). Mối liên hệ về sequence type (ST) của các chủng nghiên cứu với các chủng mang gen mã hoá carbapenemase tương tự trên thế giới được phân tích và thể hiện bằng biểu đồ.
- Để đảm bảo độ tin cậy của kết quả chỉ chọn các chủng có kết quả giải trình tự với coverage trung bình (số lần một vị trí được giải cho kết quả là cùng một loại nucleotide) $\geq 20X$.

2.5.4. Biện pháp không chế sai số:

- **Sai số do người thu thập thông tin**
 - Xây dựng quy trình thu thập số liệu bao gồm từng bước cụ thể, vai trò nhiệm vụ của những cán bộ tham gia (Chi tiết tại **Phụ lục số 4**)
 - Cán bộ tham gia được tập huấn kỹ càng về bộ câu hỏi, định nghĩa ca bệnh, phương pháp lấy mẫu và vận chuyển mẫu, quy trình thu thập số liệu (**Tài liệu tập huấn cán bộ tại Phụ lục số 4**)
- **Sai số do xét nghiệm, xử lý và phân tích số liệu**
 - Chuẩn hoá các SOPs các phương pháp xét nghiệm
 - Số liệu thu thập được làm sạch và nhập hai lần, đảm bảo tính chính xác của số liệu.
 - Xây dựng quy trình kiểm soát và nhập liệu

2.5.5. Kiểm soát tính chính xác và độ tin cậy của các kỹ thuật trong quá trình nghiên cứu

- Các qui trình lấy mẫu, xét nghiệm và sàng lọc vi khuẩn kháng kháng sinh được thực hiện theo quy trình thực hành chuẩn của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương
- Các phương pháp sử dụng trong luận án đều dựa theo các phương pháp chuẩn, đã được công bố trên các tạp chí quốc tế có uy tín.
- Trong quá trình thực hiện nhóm nghiên cứu sử dụng các mẫu đối chứng, chủng chuẩn quốc tế để đảm bảo hiệu lực và độ tin cậy của kết quả.

2.5.6. Đạo đức nghiên cứu

- Nghiên cứu nằm trong khuôn khổ Đề tài cấp nhà nước "Đánh giá thực trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn tại Việt Nam, xác định đặc điểm cấu trúc gen và yếu tố liên quan của các vi khuẩn kháng thuốc thường gặp ở Việt Nam" (Mã số: MOST: NHQT/SPĐP/02.16) đã được Hội đồng Đạo đức trong Nghiên cứu y sinh của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương phê duyệt tại văn bản số IRB-VN01057-38/2016 ngày 21/10/2016 và đã được đề tài chấp nhận cho NCS sử dụng số liệu trong nghiên cứu.
- Các nguyên tắc đạo đức trong nghiên cứu y sinh học được bảo đảm trong quá trình thực hiện nhiệm vụ:
 - Nghiên cứu phải được chấp thuận của hội đồng đạo đức trước khi triển khai.
 - Đối tượng tham gia nghiên cứu được cung cấp thông tin về nghiên cứu.
 - Đối tượng nghiên cứu tham gia nghiên cứu một cách tự nguyện và có quyền rút lui bất cứ lúc nào. Đối tượng là trẻ em thì lấy chấp thuận của cha mẹ/người bảo hộ hợp pháp
 - Đối tượng được hỗ trợ chi phí đi lại cho việc tham gia nghiên cứu.
 - Nguy cơ đối với sức khỏe của đối tượng tham gia nghiên cứu là nhỏ do mẫu được lấy là nước tiểu, mủ, dịch tỵ hầu và phân. Nguy cơ lớn nhất là có thể gây đau, đỏ, sưng, chảy máu hoặc nhiễm trùng khác khi lấy mẫu mủ hoặc gây khó chịu, kích ứng nôn khi lấy mẫu tỵ hầu. Tuy nhiên cán bộ lấy mẫu sẽ được tập huấn kỹ càng và các y cụ đều được vô trùng.
 - Chăm sóc đối tượng: Đối tượng sẽ được điều trị miễn phí trong trường hợp xảy ra các vấn đề sức khỏe do nghiên cứu gây ra như đã nêu trên.
 - Nghiên cứu đảm bảo nguyên tắc bảo mật và khuyết danh của đối tượng tham gia nghiên cứu bằng việc sử dụng mã số, bảo mật phiếu thông tin, phiếu hỏi và số liệu.

- Kết quả xét nghiệm được báo lại cho bệnh viện và lãnh đạo y tế cộng đồng và người bệnh trong cộng đồng.
- Cán bộ làm nghiên cứu có nguy cơ phơi nhiễm với tác nhân gây bệnh tuy nhiên nguy cơ này được giảm thiểu bằng các trang bị bảo hộ phù hợp, mẫu bệnh phẩm được bảo quản, vận chuyển và xét nghiệm theo đúng các quy định về an toàn sinh học.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Thông tin chung của đối tượng nghiên cứu

Bảng 3.1. Thông tin chung của đối tượng nghiên cứu

	Đặc điểm	Tần số	%
Khoảng tuổi	<18	461	32,2
	18-29	142	9,92
	30-45	276	19,3
	46-60	305	21,3
	>60	248	17,3
Giới tính	Nam	673	47,0
	Nữ	759	53,0
Tỉnh thành	Hà Nội	198	13,8
	Hà Nam	200	14,0
	Hải Dương	200	14,0
	Bắc Ninh	198	13,8
	Thừa Thiên Huế	137	9,6
	Khánh Hòa	200	14,0
	Bến Tre	99	6,9
	Cần Thơ	200	14,0
Trình độ học vấn	Không biết chữ	323	22,6
	Tiểu học	308	21,5
	Trung học cơ sở	358	25,0
	Thpt/Bỏ túc	243	17,0
	Đại học /cao đẳng/ Trung cấp	200	14,0
Nghề nghiệp	Trẻ em/học sinh	434	30,3
	Làm ruộng/hoa màu	440	30,7
	Cán bộ công chức nhà nước	127	8,9
	Nội trợ, công việc tại nhà	170	11,9
	Công nhân, viên chức nghỉ hưu	101	7,1

	Khác (buôn bán...)	160	11,2
Bệnh mãn tính kèm theo	Có	183	12,8
	Không	1215	84,8
	Không biết	34	2,37
Nằm viện điều trị trong vòng 3 tháng	Có	105	7,3
	Không	1314	91,8
	Không nhớ	13	0,9
Loại bệnh phần phân lập	Nước tiểu	364	25,4
	Mủ	366	25,6
	Phân	377	26,3
	Tỵ hầu	325	22,7

Tổng số 1432 đối tượng tham gia nghiên cứu trong đó chủ yếu là người ≤ 45 tuổi, 61,4% (879/1432), đặc biệt nhóm người dưới 18 tuổi chiếm tới 32,2% (461/1432). Tỷ lệ nam và nữ tham gia nghiên cứu khá tương đồng với nam – 47,0%, nữ - 53,0%. Đối tượng tham gia từ các tỉnh cũng đồng đều, trừ Bến Tre và Thừa Thiên Huế có số lượng mẫu thấp hơn so với các tỉnh còn lại. Phần lớn người tham gia nghiên cứu là trẻ em/học sinh hoặc người làm nông nghiệp (lần lượt là 30,3% và 30,7%), cũng tương ứng với tỷ lệ cao người không biết chữ hoặc có trình độ học vấn tiểu học (22,6% và 21,5%). Trong số 183 người (12,8%) đã từng có tiền sử mắc bệnh mạn tính.

Bảng 3.2. Điều kiện sinh hoạt của gia đình

	Đặc điểm	Tần số	%
Nguồn nước chính sử dụng cho ăn uống	Nước máy	962	67,2
	Nước mưa/sông/suối	268	18,7
	Nước giếng khoan/đào	202	14,1
	Hồ xí tự hoại	1361	95,0
Loại nhà vệ sinh	Hồ xí 1 hoặc 2 ngăn, đi vệ sinh xuống sông/ao hồ	71	5,0

Trong số 962 đối tượng (67,2% tổng số) sử dụng nước máy như là nguồn nước chính sử dụng cho ăn uống, và tỷ lệ sử dụng nước mưa, sông, suối, giếng khoan còn cao 33,8%.

3.2. Tỷ lệ kháng kháng sinh của một số loại vi khuẩn thường gặp của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã một số tỉnh Việt Nam năm 2018-2019.

3.2.1. Đặc điểm của một số loại vi khuẩn thường gặp phân lập được tại cộng đồng

Bảng 3.3. Phân bố các vi khuẩn theo loại bệnh phẩm (n = 691, p<0,001)

ST T	Các chủng vi khuẩn phân lập được	Tổng (%)	Nước tiểu (n=185)	Mủ (n=145)	Phân (n=233)	Dịch ty hầu (n=128)
1	<i>Acinetobacter</i>	35 (5,1%)	19 (10,3%)	6 (4,1%)	2 (0,9%)	8 (6,3%)
2	<i>E.coli</i>	237 (34,3%)	15 (8,1%)	60 (41,4%)	158 (67,8%)	4 (3,1%)
3	<i>Enterobacter</i>	95 (13,7%)	30 (16,2%)	13 (9,0%)	27 (11,6%)	25 (19,5%)
4	<i>Enterococcus</i>	25 (3,6%)	5 (2,7%)	14 (0,7%)	1 (0,4%)	5 (3,9%)
5	<i>Klebsiella</i>	51 (7,4%)	13 (7,0%)	9 (6,2%)	19 (8,2%)	10 (7,8%)
6	<i>Pseudomonas</i>	122 (17,7%)	40 (21,6%)	34 (23,4%)	22 (9,4%)	26 (20,3%)
7	<i>Staphylococcus</i>	117 (16,9%)	63 (34,1%)	4 (2,8%)	1 (0,4%)	49 (38,3%)
8	Khác (<i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rhizobium</i>)	9 (1,3%)	0 (0,0%)	5 (3,4%)	3 (1,3%)	1 (0,8%)

Trong số 1432 mẫu bệnh phẩm của nghiên cứu, phân lập được 691 vi khuẩn. Trong đó *E.coli* có tỷ lệ cao nhất 237/691 chủng (chiếm 34,3%), tiếp đến là *Pseudomonas* (17,7%), *Staphylococcus* (16,9%), *Enterobacter* 13,7%, tiếp đến là *Klebsiella* spp. (7,4%), *Acinetobacter* (5,1%) và *Enterococcus* 3,6%. Một số loài khác phát hiện với tỷ lệ rất thấp bao gồm *Proteus*, *Salmonella*, *Microbacterium*, *Rhizobium* với tổng số 9 chủng chiếm 1,3%.

Qua số liệu này cho thấy *E.coli* vẫn là vi khuẩn có mặt phổ biến, *Klebsiella* spp. đứng thứ 4. Tuy nhiên, các báo cáo hiện nay cho thấy có sự gia tăng tỷ lệ nhiễm trùng mắc phải tại cộng đồng do *E.coli* và *Klebsiella pneumoniae* sản xuất ESBLs và đã gây ra mối đe dọa nghiêm trọng đối với sức khỏe cộng đồng. Tại Việt Nam, có rất ít dữ liệu về nhiễm trùng mắc phải tại cộng đồng do 2 chủng vi khuẩn nói trên, do vậy, chúng tôi lựa chọn 2 nhóm vi khuẩn này để nghiên cứu đặc điểm kháng kháng sinh tại cộng đồng. Do đó nghiên cứu sinh chọn vi khuẩn *E.coli* và *Klebsiella* spp. để nghiên cứu đặc điểm kháng kháng sinh trên người bệnh nhiễm khuẩn cộng đồng.

3.2.2. Đặc điểm sinh học phân tử và kháng kháng sinh của vi khuẩn

E.coli

3.2.2.1 Đặc điểm chung của đối tượng mang vi khuẩn *E.coli* phân lập được

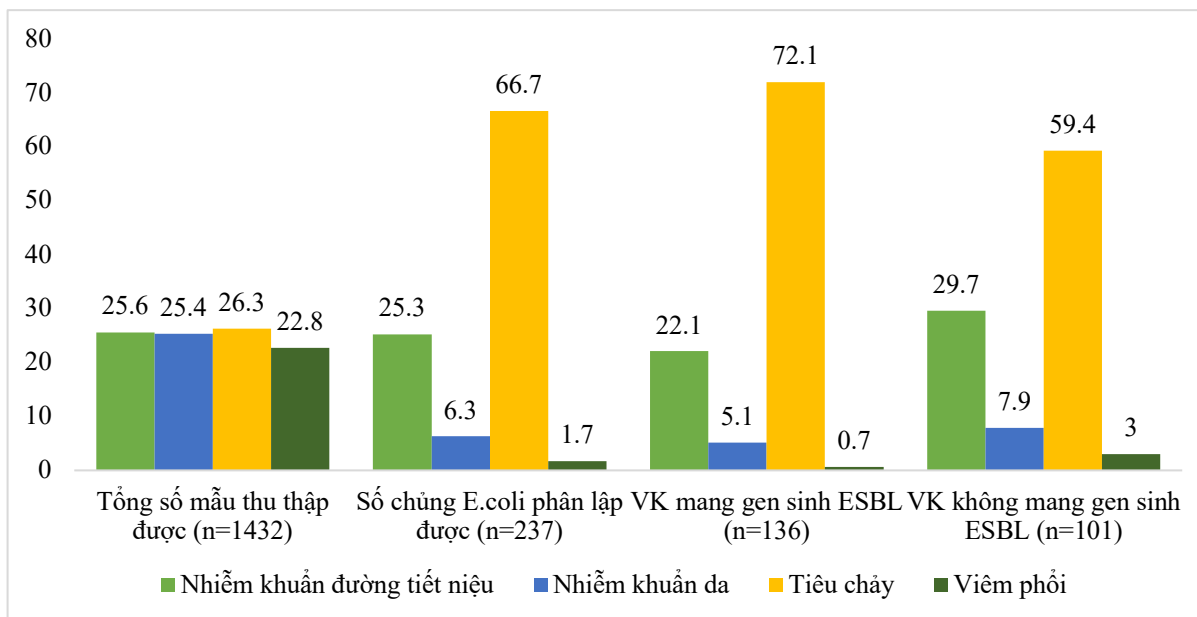
Bảng 3.4. Đặc điểm nhân khẩu học của người mang chủng *E.coli* (N = 237)

Đặc điểm	Tần số	%
Khoảng tuổi	<18	99
	18-29	17
	30-45	47
	46-60	47
	>60	27
Giới tính	Nam	112
	Nữ	125
Tỉnh thành	Hà Nội	37
	Hà Nam	36
	Hải Dương	37
	Bắc Ninh	24
	Thừa Thiên Huế	18
	Khánh Hòa	35
	Bến Tre	17
	Cần Thơ	33
Trình độ học vấn	Không biết chữ	79
	Tiểu học	35
	Trung học cơ sở	50
	Thpt/Bỏ túc	39

	Đại học /cao đẳng/ Trung cấp	34	14,3
Nghề nghiệp	Trẻ em/học sinh	90	38
	Làm ruộng/hoa màu	54	22,8
	Cán bộ công chức nhà nước	5	2,1
	Nội trợ, công việc tại nhà	44	18,5
	Công nhân, viên chức nghỉ hưu	30	12,7
	Khác (buôn bán...)	14	5,9
Tổng thu nhập trung bình hàng tháng của cả gia đình	Dưới 3 triệu	16	6,7
	Từ 3 - 5 triệu	53	22,4
	6-10 triệu	131	55,3
	Trên 10 triệu	19	8
	Không biết	18	7,6
Bệnh mãn tính kèm theo	Có	25	10,6
	Không	207	87,3
	Không biết	5	2,1
Loại bệnh phẩn phân lập	Nước tiểu	15	6,3
	Mủ	60	25,3
	Phân	158	66,7
	Tỵ hầu	4	1,7

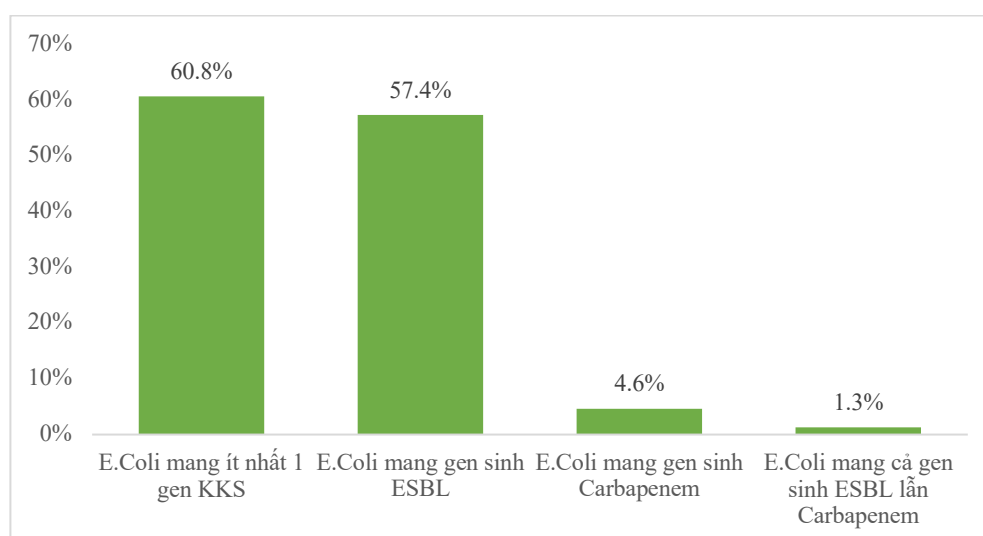
Trong những người bệnh tham gia nghiên cứu có phân lập được vi khuẩn *E.coli* chủ yếu ở người ≤ 18 tuổi (41,8%), tiếp đến là nhóm 30-45 và nhóm 46-60 nhóm tuổi chiếm 19,8 %. Tỷ lệ nam và nữ tham gia nghiên cứu khá tương đồng. Phần lớn trong số họ là trẻ em/học sinh hoặc người làm nông nghiệp (61,8%), cũng tương ứng với tỷ lệ cao người không biết chữ hoặc có trình độ học vấn tiểu học. Có 10,5% trong số họ có các bệnh mãn tính. Trong số *E.coli* phân lập được, 66,7% từ mẫu phân, tiếp đến là mẫu mủ 25,3%, nước tiểu 6,3% và tỵ hầu là 1,7%.

3.2.2.2 Đặc điểm các gen kháng kháng sinh ở các vi khuẩn *E. coli* phân tích bằng kỹ thuật PCR



Biểu đồ 3.1. Tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* phân lập được và sinh ESBLs theo nhóm bệnh.

Trong tổng số 1432 mẫu thu thập được từ các đối tượng tham gia nghiên cứu số lượng chủng *E. coli* phân lập được là 237 (chiếm 16,6% tổng số mẫu bệnh phẩm). Tuy nhiên tỷ lệ *E. coli* khác nhau ở các loại bệnh phẩm. *E. coli* ở mẫu bệnh phẩm tiêu chảy có tỷ lệ cao nhất, tiếp theo là nhiễm khuẩn tiết niệu (25,3%), nhiễm khuẩn da (6,3%) và viêm phổi (1,7%) .



Biểu đồ 3.2. Tỷ lệ *E. coli* mang gen kháng kháng sinh (N=237)

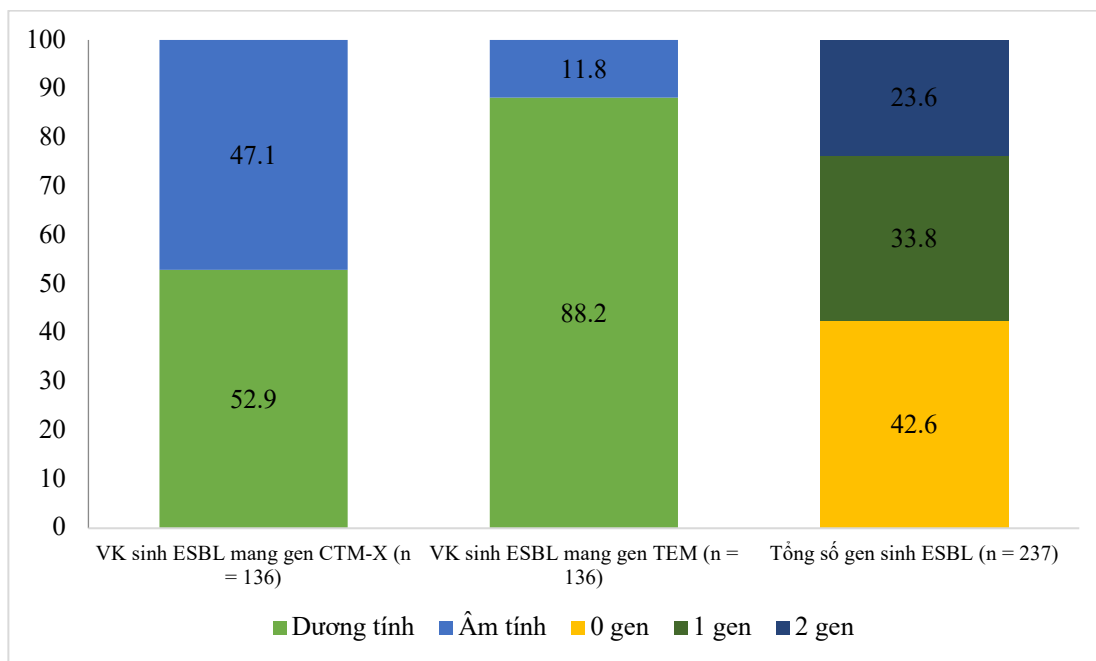
Trong số 237 *E. coli* phân lập được thì có 144 (60,8%) mang ít nhất một gen kháng kháng sinh. Trong khi số vi khuẩn mang gen mã hóa sinh ESBLs lên tới 136 (57,4%), số vi khuẩn mang gen sinh Carbapenem là 11 (4,6%).

Bảng 3.5. Một số đặc điểm mang gen kháng kháng sinh của *E.coli* (N=237)

Đặc điểm		Không mang gen kháng kháng sinh (n=93)	Mang gen kháng kháng sinh (n = 144)	Giá trị p
Triệu chứng	Nhiễm khuẩn tiết niệu	28 (30,1%)	32 (22,2%)	0,16
	Nhiễm khuẩn da	7 (7,5%)	8 (5,6%)	
	Tiêu chảy	55 (59,1%)	103 (71,5%)	
	Viêm phổi	3 (3,2%)	1 (0,7%)	
Khoảng tuổi	<18	26 (28,0%)	73 (50,7%)	0,002
	18-29	11 (11,8%)	6 (4,2%)	
	30-45	26 (28,0%)	21 (14,6%)	
	46-60	18 (19,4%)	29 (20,1%)	
	>60	12 (12,9%)	15 (10,4%)	
Miền	Nữ	52 (55,9%)	73 (50,7%)	<0,001
	Miền Bắc	32 (34,4%)	102 (70,8%)	
	Miền Trung	30 (32,3%)	23 (16%)	
	Miền Nam	31 (33,3%)	19 (13,2%)	
	Trẻ em/học sinh	22 (23,7%)	68 (47,2%)	
Nghề nghiệp	Làm ruộng/hoa màu	24 (25,8%)	30 (20,8%)	<0,001
	Làm việc tại/liên quan đến cơ sở y tế	0 (0%)	5 (3,47%)	
	Cán bộ công chức nhà nước	8 (8,6%)	3 (2,1%)	
	Nội trợ, công việc tại nhà	13 (14%)	17 (11,8%)	
	Công nhân, viên chức nghỉ hưu	8 (8,6%)	6 (4,17%)	
	Khác (buôn bán,,,))	18 (19,4%)	15 (10,4%)	

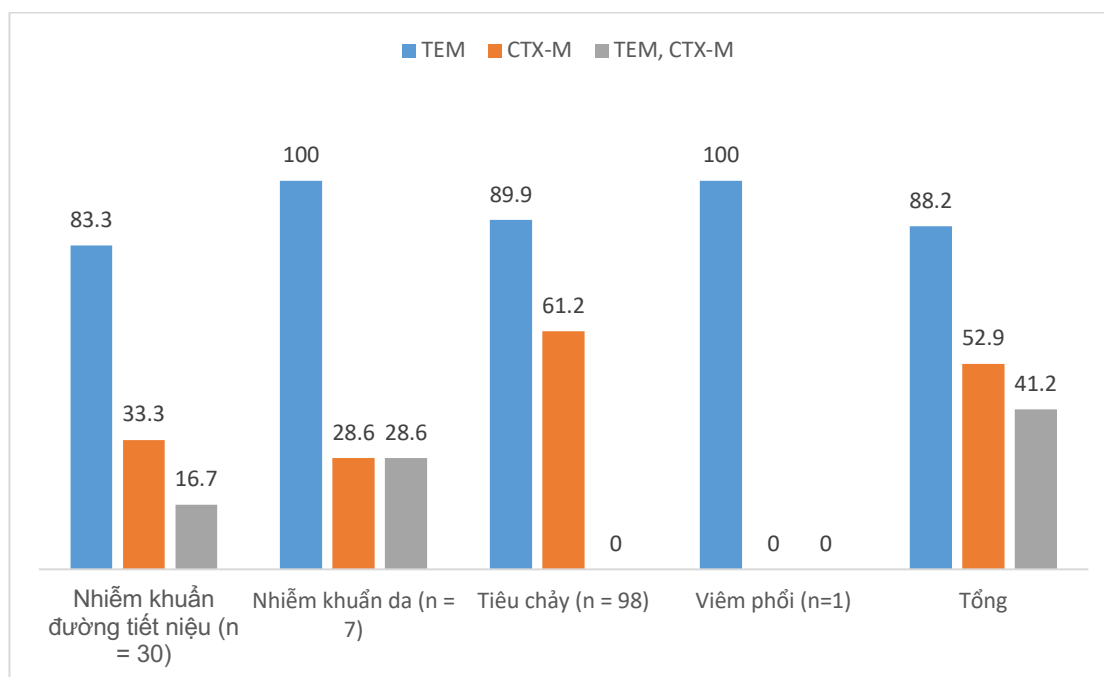
Trong các mẫu bệnh phẩm có vi khuẩn *E.coli*, vi khuẩn mang gen kháng kháng sinh ở mẫu bệnh phẩm từ phân là 71,5%, từ nhiễm khuẩn tiết niệu là 22,2%

và đa phần ở nhóm tuổi trẻ dưới 18 chiếm 50,7% so với các nhóm tuổi khác. Xét theo miền, miền Bắc có tỷ lệ vi khuẩn mang gen kháng kháng sinh so với miền Trung và miền Nam 70,8% so với 16% và 13,2%. Ngoài nhóm trẻ em <18 tuổi có tỷ lệ mang gen kháng kháng sinh cao (47,2%) thì nhóm làm ruộng/hoa màu cũng có tỷ lệ cao 20,8%, tiếp đến là nhóm nội trợ, công việc nhà 11,8%.



Biểu đồ 3.3. Đặc điểm mang gen sinh ESBLs của vi khuẩn *E.coli* (n = 237)

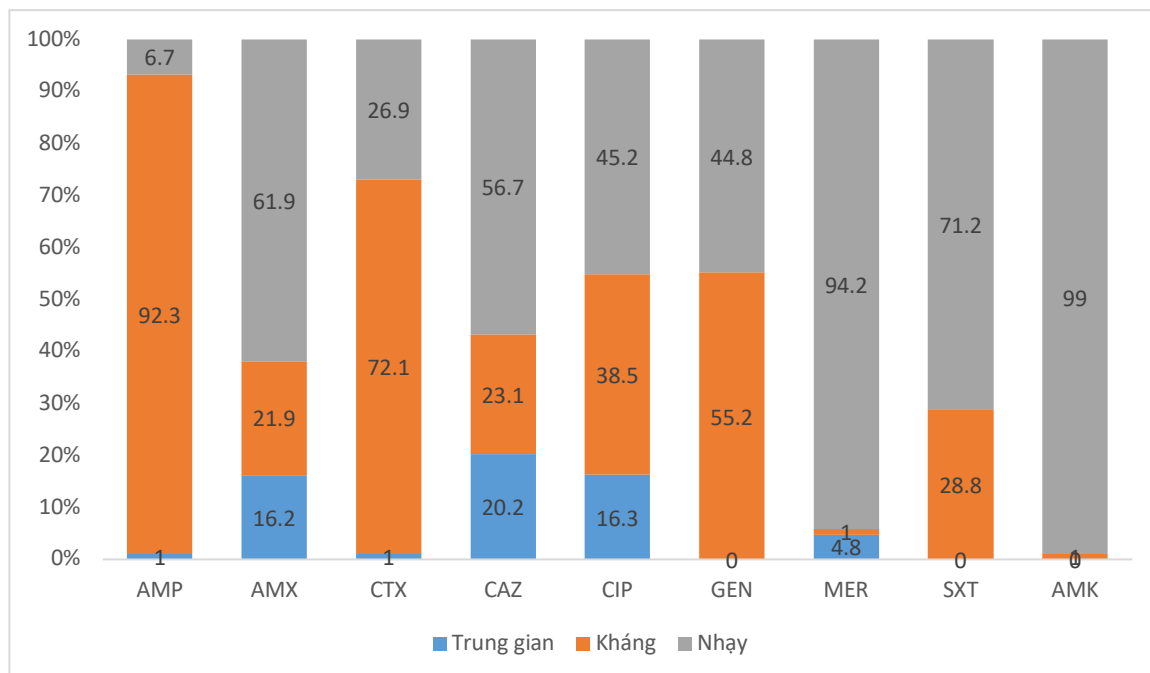
Tất cả các chủng *E.coli* phân lập được từ các mẫu bệnh phẩm được xác định gen sinh ESBLs (gen CTX-M và TEM) bằng kỹ thuật PCR. Trong 237 chủng *E. coli* có 136 chủng sinh ESBLs được phát hiện có ít nhất một gen mã hoá, chiếm tỷ lệ 57,4%. Tỷ lệ vi khuẩn *E.coli* mang cả hai gen là 23,6%.



Biểu đồ 3.4. Một số đặc điểm mang gen sinh ESBLs của vi khuẩn *E.coli* theo nhóm triệu chứng của đối tượng (n=136)

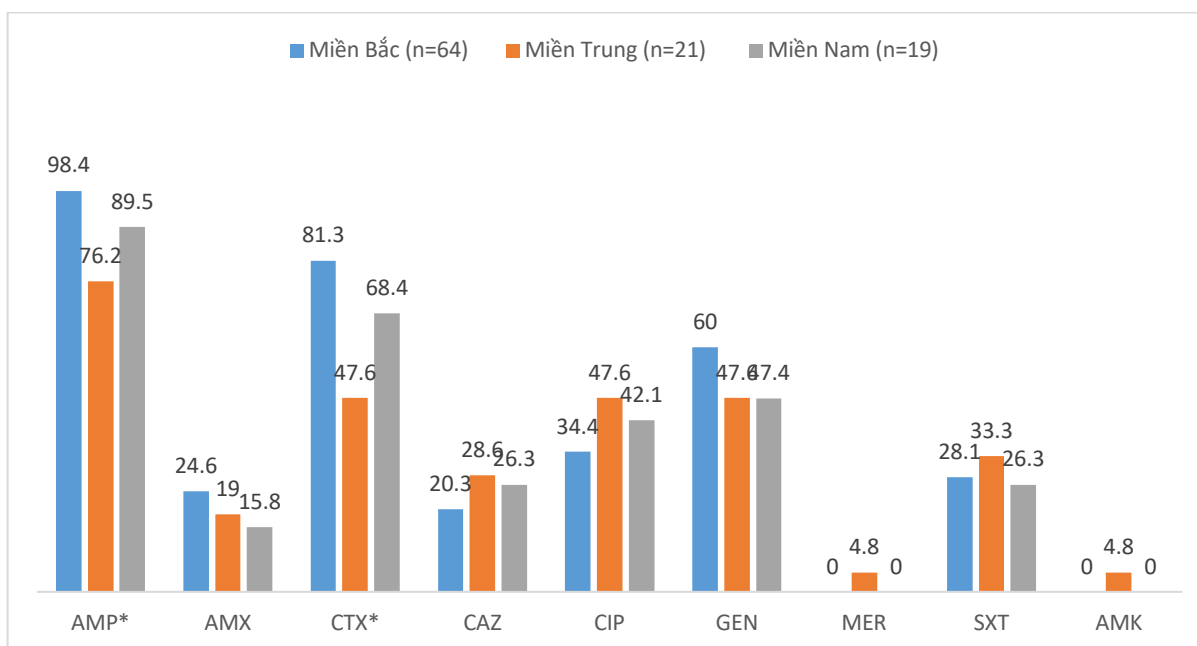
Trong số vi khuẩn mang gen sinh ESBLs, có 41,2% chứa cả hai gen: gen TEM chiếm ưu thế (88,2%), gen CTX-M (52,9%). Tỷ lệ mang gen này ở các loại bệnh phẩm khác nhau cũng khác nhau. Gen TEM cao nhất ở mẫu bệnh phẩm nhiễm trùng da (7; 100%) tiếp đó là tiêu chảy (87 mẫu, 89,9%). Với gen CTX-M, tỷ lệ mang gen lại cao nhất ở mẫu bệnh phẩm tiêu chảy 61,2%, tiếp đó là nhiễm khuẩn tiết niệu (33,3%). Tỷ lệ đồng mang 2 gen cao nhất ở mẫu bệnh phẩm tiêu chảy (50,0%), tiếp đó là nhiễm khuẩn da (28,6%), không tìm thấy ở mẫu ty hầu.

3.2.2.3 Đặc điểm kháng kháng sinh của các vi khuẩn *E.coli* theo kết quả MIC



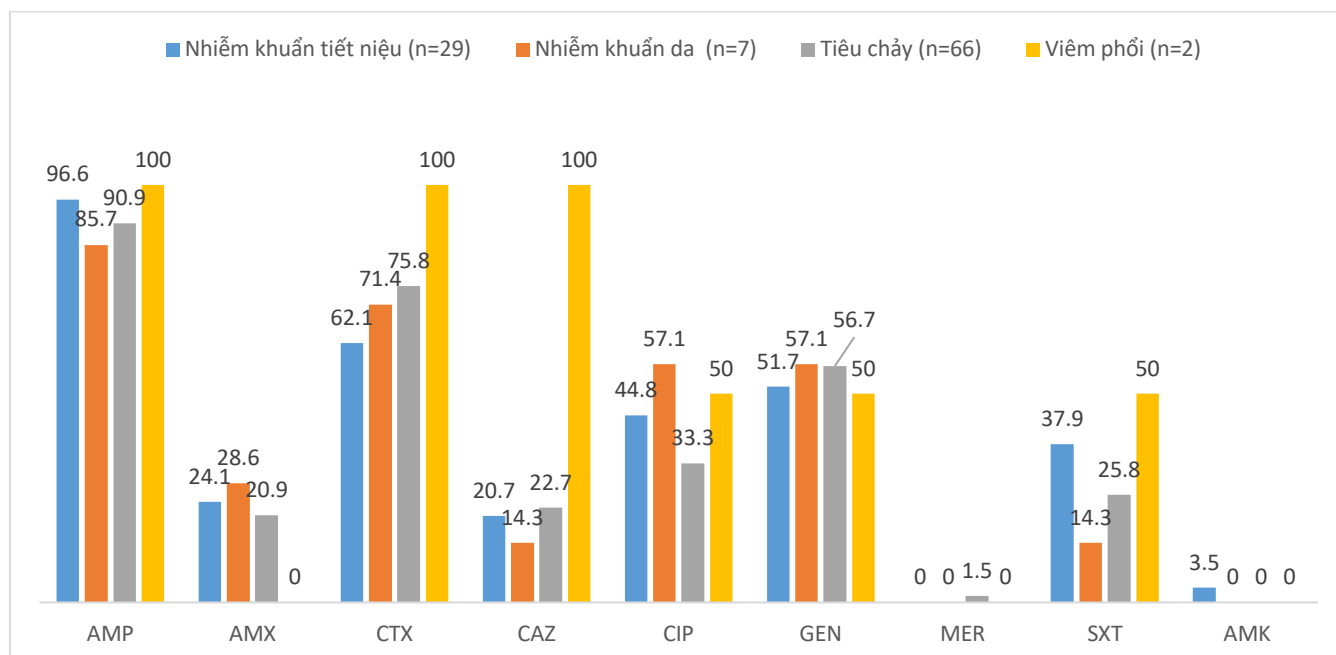
Biểu đồ 3.5. Tỷ lệ kháng của các chủng *E.coli* (N = 104) với các loại kháng sinh

Kết quả của 104 vi khuẩn *E.coli* được chọn để xác định tính nhạy cảm với các loại kháng sinh được sử dụng ở cộng đồng. 92,3% kháng với ampicilin, 21,9% kháng với amoxicillin/acid clavulanic. Với nhóm kháng sinh cephalosporin phổ rộng, 72,1% kháng với cefotaxim và 23,1% kháng và 20,2% trung gian với ceftazidime. Tỷ lệ kháng với kháng sinh nhóm Quinolon thế hệ 2 ciprofloxacin cũng ở mức 38,5% và 16,3% ở trung gian. Với nhóm sulfamid, tỷ lệ kháng khá cao ở mức 55,2% với kháng sinh kết hợp sulfamethoxazol+trimethoprim. Với nhóm aminoglycoside, 28,8% *E.coli* phân lập được kháng với gentamicin, tuy nhiên còn khá nhạy với amikacin, chỉ có 1/104 chủng kháng với kháng sinh này. Với nhóm carbapenem, *E.coli* phân lập được tại cộng đồng cũng còn nhạy, chỉ có 1/104 chủng kháng với meropenem.



Biểu đồ 3.6. Tỷ lệ kháng của các vi khuẩn *E.coli* (N = 104) với các loại kháng sinh theo miền (*): $p < 0,05$

Vi khuẩn *E.coli* kháng với hai loại kháng sinh có sự khác biệt theo miền, đó là kháng ampicillin cao nhất ở miền Bắc (98,4%), tiếp đó là miền Nam (89,5%) và thấp nhất ở miền Trung (76,2%). *E.coli* phân lập ở miền Bắc cũng kháng với cefotaxime cao nhất với 81,3% và miền Nam là 68,4%, thấp nhất ở miền Trung là 47,6%.



Biểu đồ 3.7. Đặc điểm kháng của *E.coli* theo loại nhiễm khuẩn (n = 104)

Tỷ lệ kháng với các loại kháng sinh ở các vi khuẩn *E.coli* phân lập ở các loại mẫu khác nhau cũng khá khác nhau, sự khác nhau rõ nhất với kháng sinh

cefotaxime và sulfamethoxazol+trimethoprim. Tuy nhiên do số vi khuẩn *E.coli* phân lập được từ mẫu tỵ hầu có tỷ lệ thấp nên số liệu không phản ánh chính xác sự khác biệt.

Bảng 3.6. Mức độ kháng đa thuốc của các *E. coli* (n = 104)

Số nhóm KS kháng thuốc	Số chủng	Tỉ lệ (%)	Phân loại
0	4	3,9	Không phải đa kháng (MDR) 41,4%
1	11	10,6	
2	28	26,9	
3	24	23,1	Đa kháng (MDR) 58,7%
4	23	22,1	
5	14	13,5	

Phân tích *E.coli* kháng với số lượng nhóm kháng sinh ta thấy chỉ có 4/104 chủng không có kiểu hình kháng với bất kỳ loại kháng sinh nào chiếm 3,9%, và 10,6% chủng kháng với một nhóm kháng sinh. Còn lại 58,7% đều kháng với trên 2 nhóm trở lên.

3.2.3. Đặc điểm các gen kháng kháng sinh ở các chủng *E. coli* phân tích bằng kỹ thuật giải trình tự hệ gen (WGS)

Bảng 3.7. Đặc điểm các gen kháng kháng sinh của các chủng *E.coli* bằng kỹ thuật WGS

Chủng	Loại mẫu	Địa phương	Gen mã hoá sinh Carbapenemase- & extended-spectrum β - lactamase-encoding	Gen kháng trimethopri m+sulfona mides	Gen kháng macrolide	Gen kháng tetracycline	Gen kháng fluroqui nolines	Gen kháng phenico ls	Aminoglycoside acetyltransferase- encoding genes	Bleom ycin	MLS T	Plasmid
ABNNT31	Nước tiểu	Bắc Ninh	blaEC	-	-	-	-	-	-		-	-
ABNNT37	Nước tiểu	Bắc Ninh	blaCTX-M-27, blaTEM-1B, blaEC- 5	dfrA17, sul1,	mph(A)	tet(A)	-	-	aac(3)-IId, aadA5,		131	Col156, IncFII(29), repA
ABNPH17	Phân	Bắc Ninh	-	-	-	-	-	-	-		-	-
ABNPH18	Phân	Bắc Ninh	blaCMY-42, blaNDM-5, blaEC-8	dfrA12, sul1,	mph(A)	-	-	-	aadA2,	Ble- MBL	457	IncFIA, IncFII(pRSB10 7), IncY, IncI
ABNPH31	Phân	Bắc Ninh	blaCTX-M-27, blaTEM-1B,	dfrA17, dfrA8, sul1, sul2,	mph(A)	tet(A)			aadA5, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id,		226	IncX4
ABNPH32	Phân	Bắc Ninh	blaTEM-1B, blaEC- 15	dfrA14,		tet(A)	qnrS1		-		48	IncFII, p0111
ABNPH49	Phân	Bắc Ninh	blaTEM- 1B, blaCTX-M-64, blaDHA-1, blaEC-8	dfrA17, sul1,	mph(A)	tet(D)	qnrB4,	catA1,	-		38	IncFIA, IncFII, IncFIB(pLF82)
AHDMU1 2	Mù	Hải Dương	blaCTX-M-27, blaOXA-1, blaEC	dfrA17, sul1,	mph(A)er m(B),	tet(B)	-	catA1,	aadA1, aadA5,		226	IncB/O/K/Z
AHDNT0 9	Nước tiểu	Hải Dương	-	-	-	-	-	-	-		-	-
AHDNT1 2	Nước tiểu	Hải Dương	-	-	-	-	-	-	-		-	-
AHDNT4 7	Nước tiểu	Hải Dương	blaTEM-1B, blaEC	-	mph(A)	-	-	-	-		-	

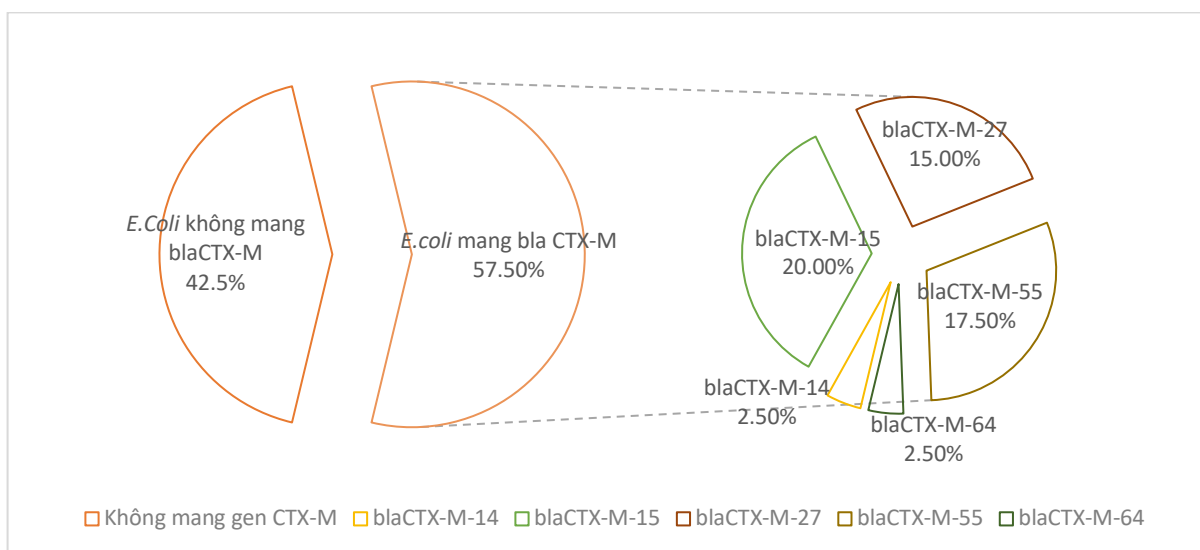
Chủng	Loại mẫu	Địa phương	Gen mã hoá sinh Carbapenemase- & extended-spectrum β -lactamase-encoding	Gen kháng trimethoprim+sulfonamides	Gen kháng macrolide	Gen kháng tetracycline	Gen kháng fluoroquinolones	Gen kháng phenicol	Aminoglycoside acetyltransferase-encoding genes	Bleomycin	MLST	Plasmid
AHDPH03	Phân	Hải Dương	blaOXA-1, blaCTX-M-14, blaEC	dfrA17, sul1,	mph(A)erm(B),	tet(B),		catA1,	aadA1, aadA5,		226	IncB/O/K/Z
AHDPH14	Phân	Hải Dương	blaCTX-M-15, blaTEM-1C, blaEC-8	dfrA17, sul1,	mph(A)erm(B),		-	-	aadA5,		38	IncY
AHDPH25	Phân	Hải Dương	blaTEM-1B, blaEC-13	dfrA14, sul2,		tet(A)	qnrS1,		aph(3'')-Ib, aph(6)-Id		423	IncFIA, IncFIB(AP001918)
AHDPH27	Phân	Hải Dương	-	dfrA17, sul1,	mph(A)	tet(B)		catB4,	-		-	-
AHNAPH13	Phân	Hà Nam	blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaEC-8	dfrA14, sul2,	-	tet(A),	qnrS1	-	aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib-cr, aadA5,		405	IncFIA, IncFIB(AP001918), p0111
AHNAPH17	Phân	Hà Nam	blaCTX-M-27, blaTEM-1B, blaCMY-2, blaEC-8	dfrA14, sul3,	-	tet(B)	-	floR,	aph(3'')-Ib, aph(6)-Id,		-	IncFII, IncFIB(K)
AHNAPH20	Phân	Hà Nam	blaCTX-M-55, blaEC-18	-	-	-	-	-	ant(3'')-Ia, aph(3')-Ia,		-	IncFIB(AP001918)
AHNAPH40	Phân	Hà Nam	blaCTX-M-15, blaEC-8	-	-	-	-	-	-		10499	-
AHNAPH48	Phân	Hà Nam	blaOXA-1, blaCTX-M-15, blaEC-6	dfrA17, sul1	mph(A)	tet(A)		catB4,	aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA5,		131	IncFIA, IncFIB(AP001918), Col156
AHNONT02	Nước tiểu	Hà Nội	blaTEM-1B, blaEC	dfrA14, sul2,	-	tet(A)	qnrS1,	floR,	aph(3'')-Ib, aph(6)-Id,		1139	-
AHNOPH10	Phân	Hà Nội	blaCTX-M-27, blaEC-15	dfrA17, sul1	mph(A)			catA1,	aadA5		10	IncFII, Col(BS512)

Chủng	Loại mẫu	Địa phương	Gen mã hoá sinh Carbapenemase- & extended-spectrum β -lactamase-encoding	Gen kháng trimethoprim+sulfonamides	Gen kháng macrolide	Gen kháng tetracycline	Gen kháng fluroquinolones	Gen kháng phenicol	Aminoglycoside acetyltransferase-encoding genes	Bleomycin	MLST	Plasmid
AHNOPH 16	Phân	Hà Nội	blaCTX-M-55, mcr-1, blaEC	dfrA14, sul3	-	tet(A),	-	floR,	aac(3)-Iia, aph(3")-Ib, aph(6)-Id, ant(3")-Ia,		10	IncFIB(AP001918), IncI2
AHNOPH 22	Phân	Hà Nội	blaCTX-M-15, blaTEM-1B, blaEC, blaEC-8	dfrA12, sul1, sul2,	mph(A)		-	-	aadA2, aph(3")-Ib, aph(6)-Id, aac(3)-IId,		43	ColpVC, Col(BS512)
AHNOPH 50	Phân	Hà Nội	blaTEM-1B, blaCTX-M-55, blaEC-18	dfrA5, sul2,	-	tet(A)	-	-	aph(3")-Ib, aph(6)-Id,		58	IncFIB(AP001918), IncFII, IncQ1, IncI1
AHNOTH 22	Tỵ hầu	Hà Nội	blaCTX-M-15, blaOXA-1,	dfrA17, sul1,	mph(A)	tet(A)	-	catB4,	aac(3)-IIa, aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib-cr, aadA5,		131	IncFIA, IncFIB(AP001918), Col156
AKHMU1 6	Mù	Khánh Hoà	blaCTX-M-55, blaTEM-1B, blaEC-18	dfrA14, sul2,	-	tet(A)	-	-	aac(3)-Iia, aph(3")-Ib, aph(3')-Ia, aph(6)-Id,		1196	IncFIB(AP001918)
AKHPH1 5	Phân	Khánh Hoà	blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaEC	dfrA17, sul1, sul2,	mph(A)	tet(B)	-	catB4,	aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib-cr, aac(3)-IIa, aadA5,		10	IncFIA, IncFIB(AP001918)
AKHPH3 9	Phân	Khánh Hoà	blaTEM-1B, blaEC-8	sul2		tet(A),	-	-	aph(3")-Ib, aph(6)-Id,		38	IncFIB(K)
AKHPH4 1	Phân	Khánh Hoà	blaCTX-M-55, blaEC	dfrA12, sul3,	-	tet(A),	-	floR	aph(3")-Ib, aph(6)-Id, aadA2, aph(3')-Ia		10	IncY
AKHTH2 5	Tỵ hầu	Khánh Hoà	blaEC	-	-	-	-	-	-		10	Col156
AKHTH2 9	Tỵ hầu	Khánh Hoà	blaEC-6	-	-	-	-	-	-		127	IncFII(pHN7A8)

Chủng	Loại mẫu	Địa phương	Gen mã hoá sinh Carbapenemase- & extended-spectrum β -lactamase-encoding	Gen kháng trimethoprim+sulfonamides	Gen kháng macrolide	Gen kháng tetracycline	Gen kháng fluoroquinolones	Gen kháng phenicol	Aminoglycoside acetyltransferase-encoding genes	Bleomycin	MLST	Plasmid
ATTHMU36	Mủ	Thừa Thiên Huế	blaOXA-1, blaTEM-1B, blaCMY-42, blaCTX-M-15, blaEC-18	dfrA17, sul1, sul2,	mph(A)	tet(B),		catB4, catA1,	aac(3)-IIa, aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib-cr, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, aadA5, aph(3')-Ia,		648	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII(pRSB107), IncQ1, Col440II, IncI
ATTHMU41	Mủ	Thừa Thiên Huế	blaEC	-	-	tet(A)	-	-	-		215	
ATTHMU43	Mủ	Thừa Thiên Huế	blaTEM-1B, blaDHA-1, blaEC-6	dfrA17, sul1	mph(A)		qnrB4,	-	-		1193	Col156, IncFIA, Col(BS512)
ATTHNT03	Nước tiểu	Thừa Thiên Huế	blaCTX-M-55, blaTEM-1B, blaEC-6,	dfrA5,	-	-	-	-	-		73	IncFIB(AP001918), IncFII, Col156, IncI1
ATTHPH02	Phân	Thừa Thiên Huế	blaCTX-M-55, blaEC-18	-	-	tet(A)	qnrS1,	-	-		345	IncFIB(AP001918), IncFIA(HI1), IncHI1A, IncHI1B(R27)
ATTHPH17	Phân	Thừa Thiên Huế	-	-	-	-	-	-	-		-	-
ABTMU10	Mủ	Bến Tre	blaCTX-M-27, blaTEM-1B, blaEC	dfrA7, sul1, sul2,	mph(A)	tet(A),	-		aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id		10	IncFII, Col156, IncQ1
ABTPH13	Phân	Bến Tre	blaTEM-1B,	dfrA12, mef(B), sul3	mdf(A),	tet(B),	-	-	aadA1, aadA2, cmlA1,		10	

Phân tích NGS của 40 chủng *E.coli* cho thấy hầu hết các chủng *E.coli* đều mang gen KKS (33/40 chủng). Trong 33 chủng mang gen kháng này, hầu hết các chủng thường mang nhiều gen kháng của ít nhất 3 loại KS kháng nhau. Các gen chiếm tỷ lệ cao bao gồm gen *blaCTX-M*, *blaTEM* và gen mã hoá aminoglycoside acetyltransfer.

3.2.3.1 Đặc điểm sinh học phân tử của gen kháng kháng sinh qua phân tích giải trình tự hệ gen của vi khuẩn *E.coli*.



Biểu đồ 3.8. Đặc điểm của *bla*CTX-M

Với các gen nhóm beta-lactamase, *bla*CTX-M có mặt ở hơn một nửa số chủng (57,7%), với các biến chủng bao gồm gen *bla*CTX-M-15 (34,78%), *bla*CTX-M-55 (30,43%), *bla*CTX-M-27 (26,09%) chiếm đa số, ngoài ra còn có mặt của *bla*CTX-M-14 và *bla*CTX-M-64 với tỷ lệ nhỏ (4,35%). Trong nhóm gen beta-lactamase nhóm A còn có sự có mặt của *bla*TEM, chiếm 42,5% số chủng. Trong đó có mặt của *bla*TEM-B chiếm đa số (42,5%) và 1 số nhỏ còn lại là *bla*TEM-C. Có 8 chủng có *bla* OXA-1 chiếm 20% số chủng được chọn phân tích NGS. Ngoài ra cũng phát hiện ra 1 chủng mang *bla*NDM-5.

Bảng 3.8. Đặc điểm các gen kháng

Gen kháng	Số lượng	Tỷ lệ %
Tetracycline	24	60
Sulphonamide	27	67,5
Fluoroquinolone	7	17,5
Colistin	1	2,5
Fosfomycin	-	-
MLS	18	45
Trimethoprim	27	67,5
Phenicols	13	32,5

Gen kháng	Số lượng	Tỷ lệ %
Bleomycin	1	2,5
Beta-lactamase	35	87,5
Class C	-	-
<i>EC</i>	33	82,5
<i>CMY</i>	3	7,5
<i>DHA</i>	2	5
Class A		
<i>LAP</i>	3	7,5
<i>CARB</i>	-	-
<i>PER</i>	-	-
<i>TEM</i>	17	42,5
<i>SHV</i>	-	-
<i>VEB</i>	-	-
<i>CTX-M</i>	23	57,5
<i>KPC</i>	-	-
Class D		
<i>OXA</i>	8	20
Class B	-	-
<i>IMP</i>	-	-
<i>NDM</i>	1	2,5
Rifamycin	-	-
Aminoglycoside	24	60
Streptothricin	-	-

Tỷ lệ các vi khuẩn mang các gen kháng các nhóm kháng sinh khác bao gồm Tetracycline, Sulphonamide, trimethoprim, aminoglycoside đều cao hơn 60%. Các gen kháng tetracycline có mặt ở 60% số chủng phân tích và bao gồm tetA, tetB, tetD, trong đó tetA chiếm đa số (17/24, tương đương 71%). 67,5% các chủng có mang gen kháng nhóm sulphonamid, bao gồm các gen sul1, sul2, sul3. Trong đó sul1 chiếm đa số (16/27 chủng). Gen kháng kháng sinh nhóm trimethoprim có mặt ở 67,5% (27/40) số chủng phân tích, trong đó có mặt của các số lượng lớn gen dfrA17, dfrA14, lần lượt là 58% (14/27) và 29% (7/27). Ngoài ra có có một

số gen khác với tỷ lệ nhỏ bao gồm *dfrA12* 12,5% (3/27), *dfrA5* (8%) và *dfrA8* (4%). Nhóm gen mã hoá enzym Aminoglycoside có mặt ở 60% số chủng phân tích NGS và các gen thay đổi enzym aminoglycoside được ghi nhận có sự đa dạng, bao gồm *aph(6)*-Id có mặt ở 54% (13/24) số chủng phân tích, tiếp đến là *aph(3'')*-Ib và *aadA5*, 46% (11/24). Ngoài ra còn có sự có mặt của các gen *aac(3)*-Iid (30%), *aac(6')*-Ib-cr (21%). Các gen *aadA1*, *aadA*, 2, *ant(3'')*-Ia, *aac(3)*-Iia, và *aph(3')*-Ia cũng có mặt với số lượng nhỏ.

Các chủng mang các gen kháng với các loại kháng sinh nhóm Macrolides, Fluoroquinolone, Phenicol có mặt ở 17,7%-45% số chủng phân tích. 45% số chủng có mang gen kháng với nhóm kháng sinh macrolid, trong đó 94% các chủng mang gen *mph(A)* và 6% mang gen *mdf(A)*. Với nhóm kháng sinh phenicol, 32,5% chủng có mang gen kháng với nhóm kháng sinh này, trong đó gen *catA1* và *catB4* có mặt ở 38% số chủng và *floR* có tỷ lệ thấp hơn.

Có 1 chủng (2,5%) trong tổng số chủng mang gen kháng colistin và bleomycin.

3.2.4. Đặc điểm sinh học phân tử và kháng kháng sinh của các vi khuẩn *Klebsiella* spp.

3.2.4.1 Đặc điểm chung của đối tượng mang *Klebsiella* spp. phân lập được

Trong 51 đối tượng nghiên cứu phân lập được vi khuẩn *Klebsiella* spp. từ các mẫu bệnh phẩm thu được, số lượng phân lập *Klebsiella* spp. ở nữ giới nhiều hơn nam giới, số lượng *Klebsiella* spp. phân lập được từ các mẫu bệnh phẩm của người bệnh ở Hà Nội, Thừa Thiên Huế và Hải Dương lần lượt có tỷ lệ cao nhất. Phân lập được 4 loài trong đó *K.pneumoniae* chiếm đa số 37/51 chủng (72,5%), *K.oxytoca* 6 chủng (11,8%), *K.aerogenes* 5 chủng (9,8%) và *K.variicola* 3 chủng (5,9%). Hơn 1/3 số chủng được phân lập từ mẫu phân (35,3%), 27,5% từ nước tiểu, 19,6% từ tỵ hầu và 17,6% từ dịch mũi.

Bảng 3.9. Đặc điểm nhân khẩu học người mang chủng *Klebsiella* spp. (N = 51)

Đặc điểm	Tần số	%
Khoảng tuổi	<18	11
	18-29	9
	30-45	16
	46-60	7
	>60	8

Đặc điểm		Tần số	%
Giới tính	Nam	16	31,4
	Nữ	35	68,6
Tỉnh thành	Hà Nội	12	23,5
	Hà Nam	2	3,9
	Hải Dương	9	17,6
	Bắc Ninh	3	5,9
	Thừa Thiên Huế	11	21,6
	Khánh Hòa	8	15,7
	Bến Tre	4	7,8
	Cần Thơ	2	3,9
Trình độ học vấn	Không biết chữ	9	17,6
	Tiểu học	7	13,7
	Trung học cơ sở	12	23,5
	Thpt/Bổ túc	12	23,5
	Đại học /cao đẳng/ Trung cấp	11	21,6
Nghề nghiệp	Trẻ em/học sinh	7	13,7
	Làm ruộng/hoa màu	18	35,3
	Cán bộ công chức nhà nước	5	9,8
	Nội trợ, công việc tại nhà	10	19,6
	Công nhân, viên chức nghỉ hưu	2	3,9
	Khác (buôn bán,...)	9	17,6
Tổng thu nhập trung bình hàng	Dưới 3 triệu	5	9,8
	Từ 3 - 5 triệu	13	25,5
	6-10 triệu	22	43,1

Đặc điểm		Tần số	%
tháng của cả gia đình	Trên 10 triệu	7	13,7
	Không biết	4	7,8
Bệnh mãn tính kèm theo	Có	5	9,8
	Không	46	90,2
Loại bệnh phần phân lập	Nước tiểu	14	27,5
	Mủ	9	17,6
	Phân	18	35,3
	Tỵ hầu	10	19,6

3.2.4.2 Đặc điểm các gen kháng kháng sinh ở các chủng *Klebsiella* spp. phân tích bằng kỹ thuật PCR

Bảng 3.10. Một số đặc điểm mang gen KKS của *Klebsiella* spp. (N=51)

Đặc điểm		Không mang gen KKS (n=6)	Mang gen KKS (n = 45)	Giá trị p
Triệu chứng	Nhiễm khuẩn tiết niệu	2/6	7 (15,6%)	0,39
	Nhiễm khuẩn da	0	13 (28,9%)	
	Tiêu chảy	3/6	16 (35,6%)	
	Viêm phổi	1/6	9 (20%)	
Khoảng tuổi	<18	1/6	10 (22,2%)	0,71
	18-29	2/6	7 (15,6%)	
	30-45	2/6	13 (28,9%)	
	46-60	0	8 (17,8%)	
	>60	1/6	7 (15,6%)	
Giới tính	Nam	1/6	16 (35,6%)	0,36
	Nữ	5/6	29 (64,4%)	
Miền	Miền Bắc	2/6	23 (51,1%)	0,71
	Miền Trung	3/6	16 (35,6%)	
	Miền Nam	1/6	6 (13,3%)	
Nghề nghiệp	Trẻ em/học sinh	1/6	6 (13,3%)	0,40
	Làm ruộng/hoa màu	1/6	17 (37,8%)	

Cán bộ công chức nhà nước	0	5 (11,1%)
Nội trợ, công việc tại nhà	1/6	9 (20%)
Công nhân, viên chức nghỉ hưu	1/6	1 (2,2%)
Khác (buôn bán,,,,)	2/6	7 (15,6%)

Vi khuẩn phân lập từ người bệnh có triệu chứng tiêu chảy có tỷ lệ *Klebsiella* spp. mang gen kháng cao nhất chiếm 35,6%, tiếp đến từ nhiễm khuẩn da 28,9%, viêm phổi 20% và nhiễm khuẩn tiết niệu là 15,6%. Nhóm tuổi 30-45 có tỷ lệ *Klebsiella* spp. mang gen kháng cao nhất (28,9%) trong các nhóm tuổi, tiếp đó là nhóm tuổi dưới 18 chiếm 22,2%, hai nhóm 18-29 và trên 60 tuổi có tỷ lệ bằng nhau 15,6%. Tỷ lệ chủng *Klebsiella* spp. mang gen kháng ở nữ giới cao gần gấp đôi so với nam giới, 64,4% so với 35,6%. Trong đó miền Bắc có tỷ lệ chủng *Klebsiella* spp. mang gen kháng cao nhất, 51,1% tiếp đó là miền Trung là 35,6% và miền Nam 13,3%. Phân theo nghề nghiệp thì những người làm ruộng/hoa màu có tỷ lệ cao nhất 37,8%, tiếp đến nhóm nội trợ, công việc tại nhà 20%. Tuy nhiên các sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.11. Một số đặc điểm mang gen kháng kháng sinh của *Klebsiella* spp. theo nhóm triệu chứng của đối tượng mang gen kháng kháng sinh (n=51)

Đặc điểm mang gen KKS	Tổng n (%)	Nhiễm khuẩn đường tiết niệu (n = 9)	Nhiễm khuẩn da (n = 13)	Tiêu chảy (n = 19)	Viêm phổi (n=10)	Giá trị p
TEM	12 (23,5)	1 (11,1)	6 (46,2)	3 (15,8)	2 (20,0)	0,21
CTX-M	11 (21,6)	3 (33,3)	1 (7,7)	5 (26,3)	2 (20,0)	0,51
SHV	39 (76,5)	7 (77,8)	10 (76,9)	16 (84,2)	6 (60,0)	0,56
NDM-1	13 (25,5)	2 (22,2)	4 (30,8)	4 (21,1)	3 (30,0)	0,89
Tổng số chủng mang ít nhất 1 trong 4 gen	45 (88,2)	7 (77,8)	13 (100)	16 (84,2)	9 (90,0)	0,34
Tổng số chủng mang ít nhất 1 gen sinh ESBLs	41 (80,4)	7 (77,8)	12 (92,3)	16 (84,2)	6 (60,0)	0,31

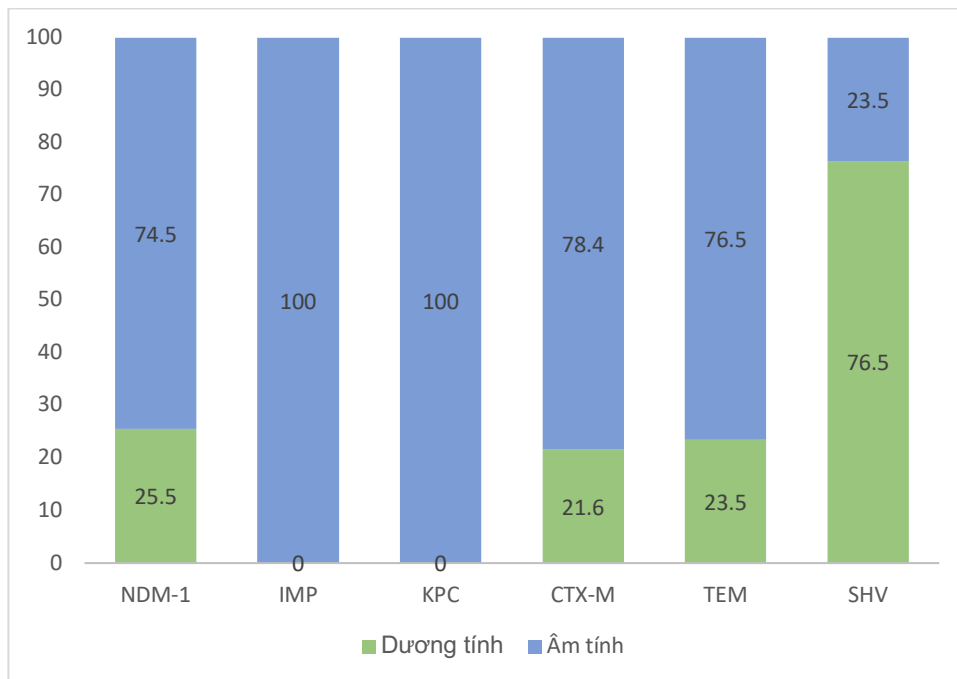
Tổng số chủng

mang cả 3 gen 5 (9,8) 1 (11,1) 0 (0) 2 (10,5) 2 (20,0) 0,42

sinh ESBLs

Cả 4 gen 9 (10,5) 2 (10,5) 3 (12,0) 4 (14,8) 0 (0) 0,56

Trong số chủng *Klebsiella* spp. phân lập được, có 88,2% chứa một trong bốn gen, với gen SHV chiếm ưu thế (76,5%), trong khi ba gen còn lại chiếm tỉ lệ xấp xỉ nhau: gen NDM-1 (25,5%), gen TEM (23,5%) và gen CTX-M (21,6%). Tỷ lệ mang gen này ở các loại bệnh phẩm khác nhau cũng khác nhau. Trong khi gen SHV và CTX-M đều chiếm tỉ lệ cao ở bệnh phẩm tiêu chảy (16; 84,6% và 5; 26,3%), gen TEM lại có tỉ lệ cao ở bệnh phẩm nhiễm khuẩn da (6; 46,2%). Tỷ lệ mang cả 4 gen là 10,5%, trong đó cao nhất ở mẫu bệnh phẩm tiêu chảy (4; 14,8%), tiếp đó là nhiễm khuẩn da (3; 12,0%) và nhiễm khuẩn tiết niệu (2; 10,5%), không tìm thấy ở mẫu tỵ hầu.



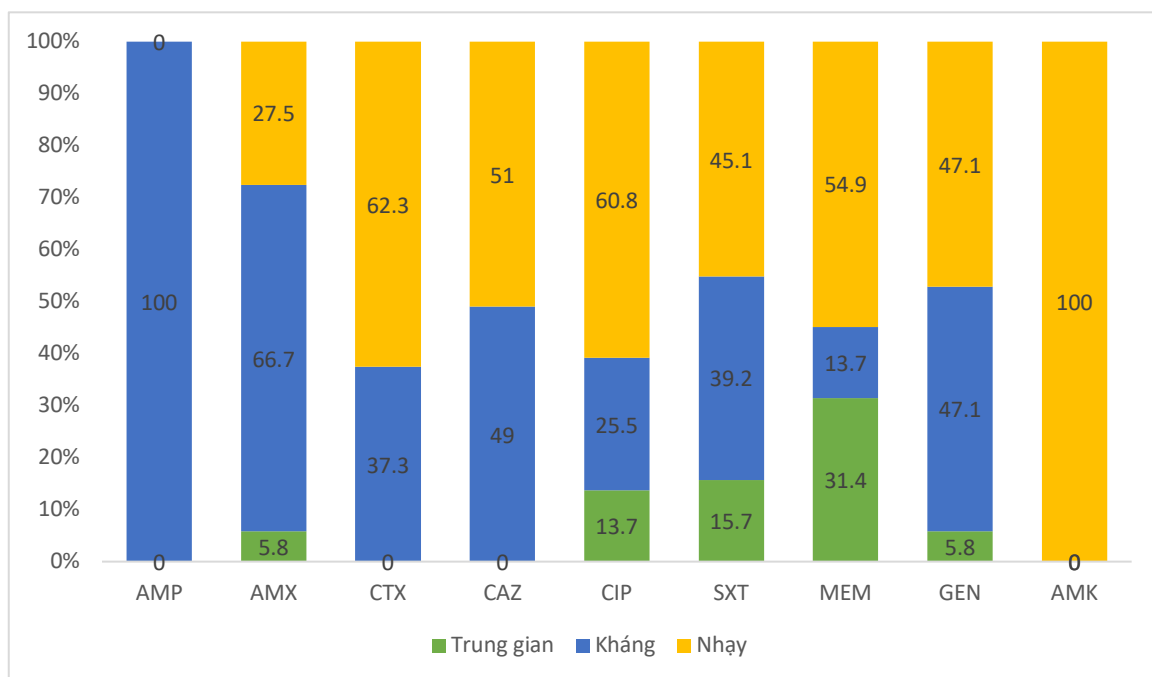
Biểu đồ 3.9. Đặc điểm mang gen kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn *Klebsiella* spp. (N=51)

11/51 (21,6%) chủng mang gen CTX-M và toàn bộ ở *K.pneumoniae*, 12 chủng mang gen TEM (23,5%) ở hai loài *K.pneumoniae* (10 chủng) và *K.oxytoca* (2 chủng) và 24 chủng mang gen SHV (47,1%) ở hai loài *K.pneumoniae* (22 chủng) và *K.variicola* (2 chủng).

Có 13/51 chủng mang gen NDM-1 (25,5%) ở hai loài *K.aerogenes* (4 chủng) và *K.pneumoniae* (9 chủng), hai loài *K.oxytoca* và *K.variicola* không mang chủng NDM-1 (sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê $p < 0,012$) và không có chủng nào mang gen IMP và KPC.

3.2.4.3 Đặc điểm kháng kháng sinh của các *Klebsiella* spp. theo kết quả

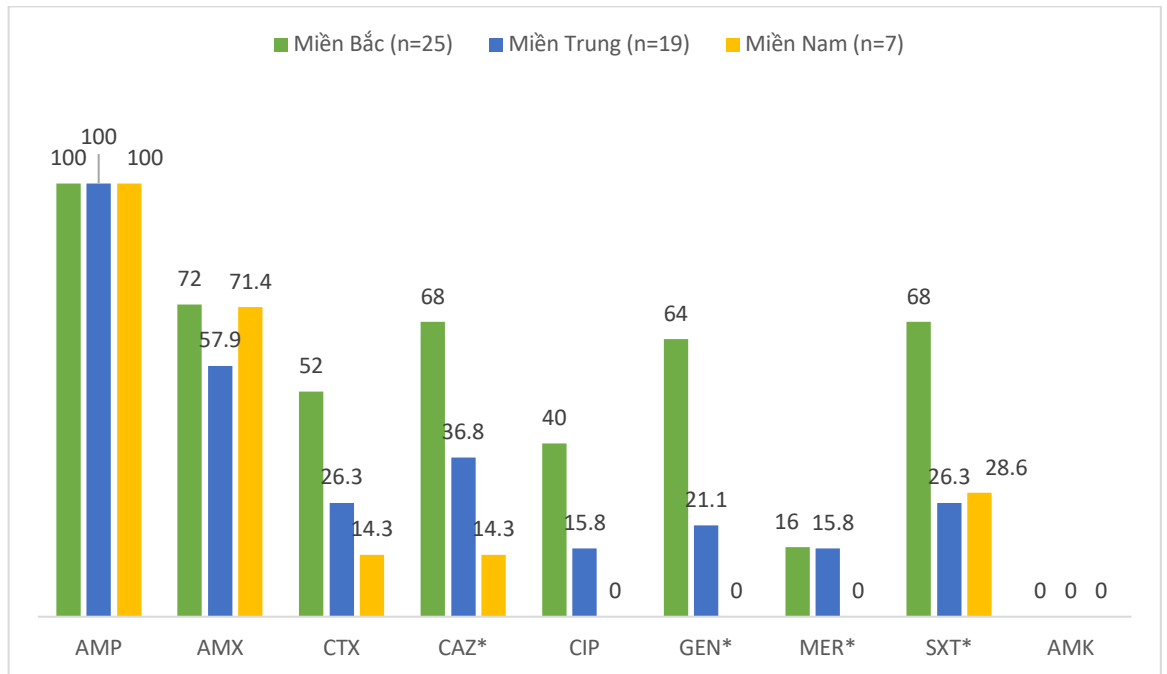
MIC



Biểu đồ 3.10. Tỷ lệ kháng của các chủng *Klebsiella* spp. (N = 51) với các loại kháng sinh

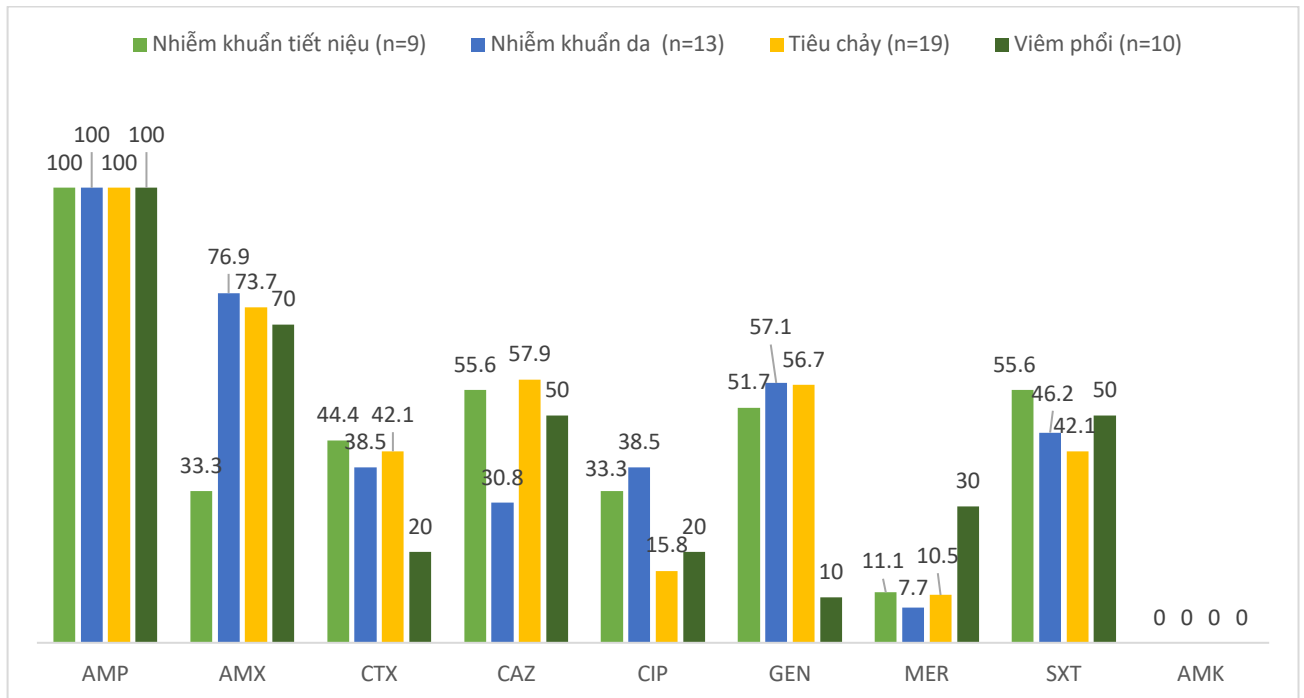
Trong 51 chủng làm MIC với các nhóm kháng sinh khác nhau, kết quả cho thấy các chủng *Klebsiella* spp. đã kháng với 8 trong 9 kháng sinh thử nghiệm. Với nhóm penicilin, 100% các chủng kháng với ampicillin và 66,7% kháng với amoxicillin + acid clavunic; đối với nhóm cephalosporin thế hệ 3, tỷ lệ kháng là 37,3% với cefotaxime và 49% với ceftazidime; 25,5% chủng kháng với ciprofloxacin (nhóm quinolon); 39,2% kháng với sulfamethoxazol + trimethoprim (nhóm co-trimoxazol); 13,7% kháng với meropenem, nhóm carbapenem, tuy nhiên tỷ lệ trung gian với kháng sinh này rất cao, lên tới 31,4%; trong khi đó nhóm Aminoglycosid có tỷ lệ kháng khác nhau giữa hai loại gentamicin (47,1%) và hoàn toàn còn nhạy với amikacin.

So sánh giữa các loài *Klebsiella* spp. khác nhau, *K.pneumoniae* kháng với 8/9 loại kháng sinh trên tiếp sau đó là *K.aerogenes*, kháng với 7/9 loại, *K.variicola* kháng với 5/9 loại và *K.oxytoca* kháng với 4/9 loại.



Biểu đồ 3.11. Tỷ lệ kháng của các *Klebsiella* spp. (N = 51) với các loại KS theo miền. (*): $p < 0,05$

Klebsiella spp. kháng với hai loại kháng sinh có sự khác biệt theo miền, đó là kháng ceftazidime cao nhất ở miền Bắc (68%), tiếp đó là miền Trung (36,8%) và thấp nhất ở miền Nam chỉ có 14,3%. Sulfamethoxazol +trimethoprim cũng tương tự, cao nhất ở miền Bắc (64%) và miền Trung 21,1%, miền Nam không có chủng nào kháng với KS này. Meropenem có tỷ lệ kháng cao nhất ở miền Bắc 16% và tương tự ở miền Trung (15,8%) và không với miền Nam là 28,6% và miền Trung là 26,3%.



Biểu đồ 3.12. Tỷ lệ kháng của các *Klebsiella* spp. (N = 51) với các loại kháng sinh theo loại nhiễm khuẩn

Toàn bộ các *Klebsiella* spp. của các loại nhiễm khuẩn đều kháng với ampicillin và các loại kháng sinh khác có tỷ lệ kháng cao ở cả các chủng ở các nhiễm khuẩn bao gồm amoxicillin + acid clavunic, ceftazidime, gentamicin và sulfamethoxazol + trimethoprim. Amikacin còn nhạy hoàn toàn với các chủng phân lập *Klebsiella* spp. được từ các nhiễm khuẩn cộng đồng.

Bảng 3.12. Mức độ đa kháng của *Klebsiella* spp. (N = 51)

Số lượng kháng sinh (N = 9)	Số chủng	Tần số (%) (N = 51)	Đơn kháng/Đa kháng
1	18	35,3	Không phải đa kháng (MDR) 52,9%
2	9	17,6	
3	7	13,7	Đa kháng (MDR) 47,1%
4	5	9,8	
5	8	15,7	
6	4	7,8	

Tỷ lệ đa kháng của *Klebsiella* spp. chiếm 47,1%. Toàn bộ vi khuẩn *Klebsiella* spp. đều kháng với ít nhất 1 nhóm kháng sinh, trong đó tỷ lệ kháng với 5 và 6 nhóm kháng sinh lên tới 23,5%.

Bảng 3.13. Đặc điểm các gen kháng thuốc của *Klebsiella* spp. và *K.pneumoniae* qua phân tích WGS

Gen kháng	<i>Klebsiella</i> spp. (n=9)	<i>K.pneumoniae</i> (n=8)
Tetracycline	4/9	4/8
Sulphonamide	6/9	6/8
Fluoroquinolone	8/9	8/8
Colistin	-	-
Fosfomycin	-	-
MLS	2/9	2/8
Trimethoprim	4/9	4/8
Phenicols	1/9	1/8
Bleomycin	1/9	1/8
Beta-lactamase	8/9	8/8
Class A		
<i>LAP</i>	1/9	1/8
<i>CARB</i>	-	-
<i>PER</i>	-	-
<i>TEM</i>	1/9	1/8
<i>SHV</i>	8/9	8/9
<i>VEB</i>	-	-
<i>CTX-M</i>	7/9	7/8
<i>KPC</i>	-	-
Class B	-	-
<i>IMP</i>	-	-
<i>NDM</i>	5/9	5/8
Class C	-	-
<i>EC</i>	-	-
<i>CMY</i>	-	-
<i>DHA</i>	2/9	2/8
Class D		
<i>OXA</i>	5/9	5/8

Gen kháng	<i>Klebsiella</i> spp. (n=9)	<i>K.pneumoniae</i> (n=8)
Rifamycin	-	-
Aminoglycoside	7/9	7/9
Streptothricin	-	-
Efflux pump	8/9	8/8

Trong 9 vi khuẩn *Klebsiella* phân tích WGS cho thấy, 8/9 là *K.pneumoniae* và 1/9 là *K.aerogenes*, vi khuẩn *K.aerogenes* không mang gen kháng, còn lại 100% *K. pneumoniae* mang nhiều loại gen kháng kháng sinh khác nhau, ít nhất là 3. Các gen có tỷ lệ cao bao gồm *blaSHV*, *bla* CTX-M, các gen bơm đẩy, gen kháng fluoroquinolone, gen mã hoá aminoglycoside acetyltransferase.

Với nhóm gen beta-lactamase, *blaSHV* đa dạng bao gồm *blaSHV*-100, *blaSHV*-80, *blaSHV*-78, *blaSHV*-67 và *blaSHV*-148. *Bla*CTX-M, có hai biến thể, *bla*CTX-M-14 và *bla*CTX-M-15. Trong khi đó *bla*OXA và *bla*NDM có mặt ở 5/9 (55,6%) *Klebsiella* spp. và 5/8 (62,5%) chủng *K. pneumoniae*. *Bla*OXA-9 chiếm ưu thế với 4/5 chủng, 1 vi khuẩn có *bla*OXA-181, trong khi toàn bộ *bla*NDM-4 có mặt ở 5 chủng.

Nhóm gen kháng với các kháng sinh sulphonamide, fluoroquinolone, aminoglycoside cũng có mặt ở hầu hết vi khuẩn phân tích NGS. 8/9 (88.9%) chủng *Klebsiella* spp. và 100% vi khuẩn *K.pneumoniae* có mặt gen kháng fluoroquinolone, trong khi đó gen kháng aminoglycoside có mặt ở 7/9 (77.8%) ở *Klebsiella* spp. và 7/8(88.9%) ở *K.pneumoniae*. Các gen kháng sulphonamide cũng có mặt ở hầu hết các chủng phân tích 6/9(66.7%) ở *Klebsiella* spp. và 6/8(75%) ở *K.pneumoniae*.

Đặc biệt ở toàn bộ *K.pneumoniae* này đều xuất hiện gen bơm đẩy, bao gồm các gen *Oqx*A, *Oqx*B, *fos*A5 và *fos*A6.

Bảng 3.14. Đặc điểm kháng với các loại kháng sinh của các chủng *K.pneumoniae* phân tích NGS

Isolate ID	Colistin		Amp		CTX		CAZ		CIP		MER		GEN		SXT		AMX		AMK		Tình trạng đa kháng
ABN-PH33	16	R	257	R	65	R	65	R	65	R	33	R	64	R	9	R	128	R	16	S	9/10
ABN-PH34	16	R	257	R	65	R	65	R	64	R	33	R	64	R	9	R	128	R	16	S	9/10
AHNOPH17	0.5	S	257	R	64	R	65	R	0.5	I	0.5	S	4	S	9	R	64	R	1	S	5/10
AKHPH31	0.5	S	257	R	1	S	65	R	0.25	S	1	S	0.25	S	2	S	64	R	1	S	2/10
ATTH-MU39	16	R	257	R	65	R	65	R	64	R	16	R	129	R	9	R	64	R	257	R	10/10
ATTH-MU48	16	R	257	R	65	R	65	R	65	R	33	R	64	R	9	R	128	R	16	S	9/10
ATTH-NT30	0.5	S	257	R	65	R	65	R	32	R	16	R	128	R	2	S	128	R	16	S	7/10
ACT-PH36	16	R	257	R	0.1	S	0.5	S	1	I	0.25	S	0.5	S	9	R	4	S	1	S	3/10
3																					
ACTNT44	0.5	S	257	R	8	R	65	R	8	R	2	I	32	R	9	R	129	R	2	S	7/10
Tổng số chủng kháng	5/9		9/9		7/9		8/9		6/9 chủng kháng 2/9 chủng trung gian		5/9 chủng kháng 1 chủng trung gian		6/9		7/9		8/9		1/9		8/9 chủng đa kháng

8/9 chủng phân lập được có tình trạng đa kháng , đáng quan tâm là 5/9 chủng kháng với colistin. Chỉ còn amikacin còn nhạy với các chủng phân lập được (1/9 chủng kháng)

3.2.5. Một số yếu tố liên quan tới tỉ lệ mang gen kháng kháng sinh ở 2 chủng *E.coli* và *Klebsiella* spp.

Bảng 3.15. Một số yếu tố liên quan tới đặc điểm không mang gen kháng ở 2 chủng *E.coli* và *Klebsiella* spp. (n = 279); n (%)

Yếu tố	Không mang gen KKS (n=91)	Mang gen KKS (n=188)	RR đơn biến (KTC 95%)	RR đa biến (KTC 95%)
Nguồn nước chính sử dụng cho ăn uống				
Nước máy	72 (38,3)	116 (61,7)	1	1
Nước mưa/sông/suối	12 (25,5)	35 (74,5)	0,7 (0,4-1,1)	0,9 (0,5-1,7)
Nước giếng khoan/đào	7 (15,9)	37 (84,1)	0,4 (0,2-0,8)*	0,5 (0,2-1)
Tình trạng cuối cùng				
Yêu cầu chuyển lên	9 (39,1)	14 (60,9)	1	
Tiếp tục điều trị	79 (36,1)	140 (63,9)	0,9 (0,5-1,6)	
Khác (khỏi bệnh, điều trị tại nhà)	3 (8,1)	34 (91,9)	0,2 (0,1-0,7)*	
Được người bán thuốc tư vấn loại KS				
Có	57 (27,9)	147 (72,1)	1	1
Không	34 (45,3)	41 (54,7)	1,6 (1,2-2,3)*	1,5 (1,1-2,0)*

(*): $p < 0,05$

Trong số các yếu tố được xem xét là yếu tố có liên quan, nguồn nước sinh hoạt, tình trạng chuyển viện, được tư vấn khi mua thuốc tại hiệu thuốc có ý nghĩa thống kê liên quan đến mang gen KKS của đối tượng nghiên cứu. Những người sống ở gia đình có dùng nước giếng đào/giếng khoan cho ăn uống có nguy cơ không mang gen KKS thấp hơn 0,4 lần so với những gia đình dùng nước máy hoặc nước mưa. Những người không phải chuyển viện lên tuyến trên thì có nguy cơ không mang gen thấp hơn 0,2 lần so với những người có tình trạng phải chuyển tới bệnh viện để điều trị thì. Tuy nhiên yếu tố này không có ý nghĩa khi đưa vào mô hình đa biến. Những người không được người bán thuốc tư vấn loại kháng

sinh có khả năng không mang gen kháng kháng sinh nào cao hơn 1,5 lần (KTC95%: 1,1-2,0) so với nhóm được tư vấn.

3.3. Thực trạng kiến thức sử dụng kháng sinh của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã một số tỉnh Việt Nam năm 2018-2019.

3.3.1. Kiến thức của đối tượng tham gia nghiên cứu về sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh

Bảng 3.16. Mức độ kiến thức sử dụng KS của đối tượng nghiên cứu theo ba miền (n=1432)

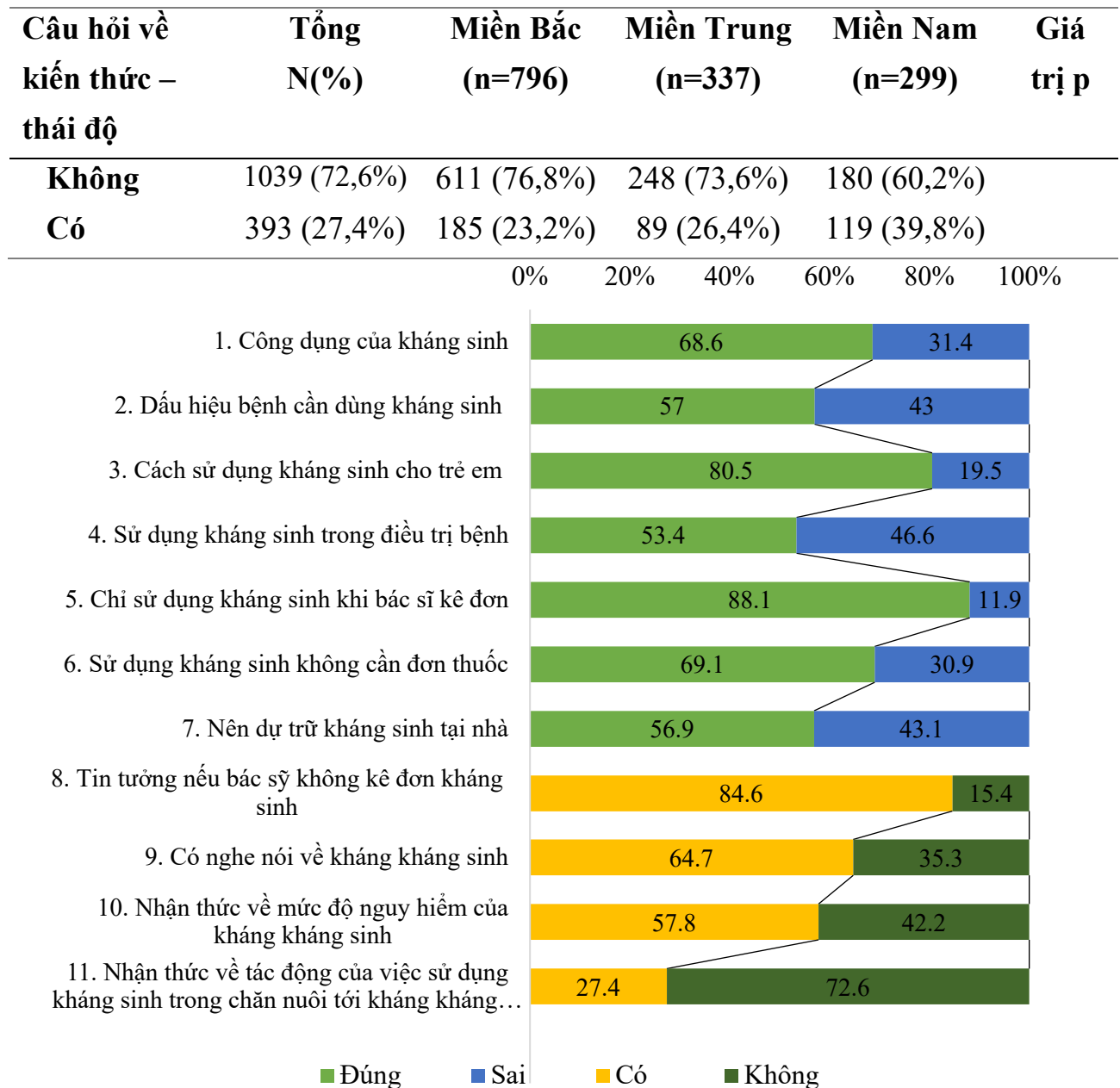
Đặc điểm	Tổng	Miền Bắc (n=796)	Miền Trung (n=337)	Miền Nam (n=299)	Giá trị p
Tổng điểm kiến thức, trung vị (tứ phân vị)	7 (5, 8)	6 (4, 8)	7 (5, 8)	7 (6, 8)	<0,001
Mức độ kiến thức					<0,001
Chưa đạt	916 (64%)	545 (68,5%)	213 (63,2%)	158 (52,8%)	
Đạt	516 (36%)	251 (31,5%)	124 (36,8%)	141 (47,2%)	

Bảng 3.15 cho thấy kiến thức của các đối tượng tại cả ba miền đều đạt mức đạt (tuy nhiên miền Bắc có điểm thấp hơn (6/11) so với miền miền Trung, miền Nam trung vị 7/11 điểm. Xét về tỷ lệ có kiến thức đạt, chỉ có 36% đối tượng được hỏi có kiến thức đạt, ở miền Bắc thấp nhất (31,5%), và cao nhất ở miền Nam (47,3%), miền Trung có tỷ lệ 36,8% sự khác biệt này đều có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.17. Kiến thức đúng về sử dụng kháng sinh theo miền

Câu hỏi về kiến thức – thái độ	Tổng N(%)	Miền Bắc (n=796)	Miền Trung (n=337)	Miền Nam (n=299)	Giá trị p
Công dụng KS để điều trị vi khuẩn/ vi rút					<0,001
Sai	450 (31,4%)	273 (34,3%)	148 (43,9%)	29 (9,7%)	

Câu hỏi về kiến thức – thái độ	Tổng N(%)	Miền Bắc (n=796)	Miền Trung (n=337)	Miền Nam (n=299)	Giá trị p
Đúng	982 (68,6%)	523 (65,7%)	189 (56,1%)	270 (90,3%)	
Dấu hiệu bệnh cần sử dụng tới KS					<0,001
Sai	816 (57,0%)	526 (66,1%)	175 (51,9%)	115 (38,5%)	
Đúng	616 (43,0%)	270 (33,9%)	162 (48,1%)	184 (61,5%)	
Cách sử dụng KS đúng cho trẻ em					<0,001
Sai	279 (19,5%)	107 (13,4%)	67 (19,9%)	105 (35,1%)	
Đúng	1153 (80,5%)	689 (86,6%)	270 (80,1%)	194 (64,9%)	
Luôn cần KS trong điều trị bệnh					0,15
Sai	667 (46,6%)	367 (46,1%)	147 (43,6%)	153 (51,2%)	
Đúng	765 (53,4%)	429 (53,9%)	190 (56,4%)	146 (48,8%)	
Chỉ sử dụng KS do bác sĩ kê đơn					<0,001
Sai	171 (11,9%)	134 (16,8%)	21 (6,23%)	16 (5,35%)	
Đúng	1261 (88,1%)	662 (83,2%)	316 (93,8%)	283 (94,6%)	
Sử dụng KS mà không cần đơn thuốc của bác sĩ					0,005
Sai	442 (30,9%)	270 (33,9%)	101 (30%)	71 (23,7%)	
Đúng	990 (69,1%)	526 (66,1%)	236 (70%)	228 (76,3%)	
Tin tưởng nếu bác sĩ không kê đơn KS					<0,001
Không	235 (16,4%)	157 (19,7%)	57 (16,9%)	21 (7,02%)	
Có	1197 (83,6%)	639 (80,3%)	280 (83,1%)	278 (93%)	
Nên dự trữ KS tại nhà					<0,001
Sai	617 (43,1%)	429 (53,9%)	101 (30%)	87 (29,1%)	
Đúng	815 (56,9%)	367 (46,1%)	236 (70%)	212 (70,9%)	
Mức độ nguy hiểm của KKS					<0,001
Không nguy hiểm	604 (42,2%)	445 (55,9%)	107 (31,8%)	52 (17,4%)	
Nguy hiểm/ Rất nguy hiểm	828 (57,8%)	351 (44,1%)	230 (68,2%)	247 (82,6%)	
Tác động của sử dụng KS trong chăn nuôi tới KKS					<0,001



Biểu đồ 3.13. Kiến thức của đối tượng nghiên cứu về kháng sinh và kháng kháng sinh

Nghiên cứu sử dụng 11 câu hỏi khác nhau để tìm hiểu kiến thức của người dân về kháng sinh, cách sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh. Qua Bảng 3.16 và Biểu đồ 3.13 cho thấy câu hỏi về công dụng của kháng sinh thì chỉ có 59,6% số người trả lời đúng “Kháng sinh được sử dụng để điều trị vi khuẩn” và 31,4% người trả lời sai là “kháng sinh dùng để điều trị cho vi rút” hoặc “không biết”, trong đó có sự khác biệt rõ ràng và có ý nghĩa thống kê giữa 3 miền, miền Trung có tỷ lệ người trả lời sai cao nhất (43,9%), miền Bắc có tỷ lệ trả lời sai là 34,3% trong khi miền Nam tỷ lệ này chỉ có 9,7%.

Câu hỏi về bệnh cần sử dụng kháng sinh thì tỷ lệ trả lời sai cao hơn rất nhiều, 57% số người được hỏi trả lời sai về bệnh cần sử dụng kháng sinh để điều trị. Các câu trả lời sai được lựa chọn bao gồm “hắt hơi, sổ mũi, đau đầu, đau bụng, đau cơ xương khớp, không biết”. Trong đó miền Bắc là nơi có số người trả lời sai nhiều nhất (66,1%), tiếp đến là miền Trung (51,9%) và miền Nam vẫn là nơi có tỷ lệ trả lời sai thấp nhất (38,5%).

Với kiến thức về cách sử dụng kháng sinh cho trẻ em thì đa phần (80,5%) đối tượng tham gia trả lời đúng với câu trả lời “kháng sinh trẻ em dùng khác biệt và khác liều với người lớn”, cũng có sự khác biệt theo miền. Ở kiến thức này, tỷ lệ trả lời đúng cao nhất lại là miền Bắc 86,6%, tiếp đến là miền Trung (80,1%) và thấp nhất là miền Nam 64,9%.

Câu hỏi về kiến thức về mức độ cần thiết của việc sử dụng kháng sinh, 46,6% đối tượng trả lời sai rằng “kháng sinh luôn luôn cần trong điều trị bệnh”, và miền Trung có tỷ lệ trả lời sai ít nhất với 43,6%, tiếp đến là miền Bắc 46,1% và miền Nam hơn nửa số người trả lời sai với 51,2%, sự khác biệt này đều có ý nghĩa thống kê.

Các câu hỏi của đối tượng nghiên cứu về vai trò của bác sĩ trong việc kê đơn, kiến thức của đối tượng tốt hơn ở nhóm kiến thức này. 88,1% đối tượng cho rằng “chỉ nên sử dụng kháng sinh khi được bác sĩ kê đơn”, kiến thức này cao nhất ở miền Nam 94,6%, miền Trung 93,8% và miền Bắc thấp nhất 83,2%. 69,1% đối tượng được hỏi cho rằng “mua thuốc tại hiệu thuốc phải có đơn của bác sĩ”. Tỷ lệ này cũng cao nhất ở miền Nam 76,3%, miền Trung (70%) và thấp nhất ở miền Bắc 66,1%. 83,6% số người được hỏi trả lời “có tin tưởng vào đơn của bác sĩ nếu không kê thuốc KS trong đơn”, tỷ lệ này cao nhất ở miền Nam (93%), miền Trung 83,1% và thấp nhất ở miền Bắc 80,3%. Kiến thức về việc lưu trữ kháng sinh, 56,9% đối tượng có kiến thức sai rằng “kháng sinh nên dự trữ tại nhà”. Tỷ lệ sai này cao nhất ở miền Nam 70,9% và tiếp đến là miền Trung 70% và miền Bắc là 46,1%.

Liên quan đến kiến thức về kháng kháng sinh, 42,2% đối tượng được hỏi kiến thức sai rằng “kháng kháng sinh là không nguy hiểm”, tỷ lệ kiến thức sai này cao nhất ở miền Bắc 55,9%, tiếp đến là miền Trung 31,8% và miền Nam có tỷ lệ kiến thức sai thấp nhất là 17,4%. 72,6% số người được hỏi kiến thức sai rằng “sử

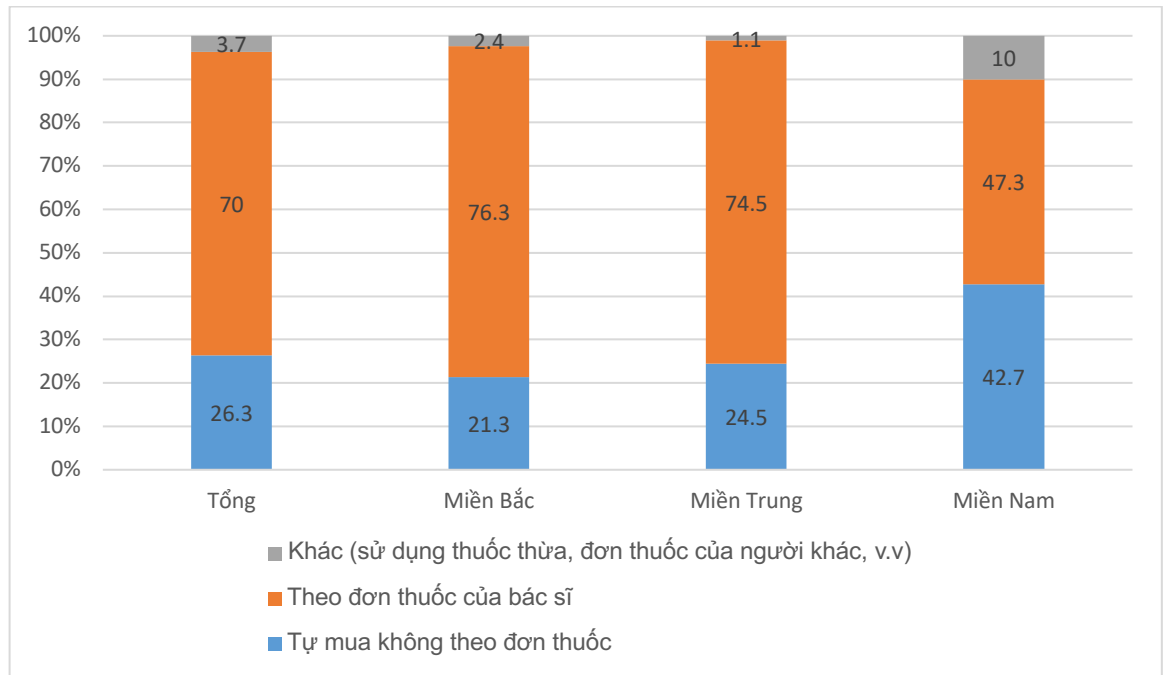
dụng kháng sinh trong chăn nuôi không có tác động tới kháng kháng sinh”, tỷ lệ sai này cao nhất ở miền Bắc 76,8% tiếp đến là miền Trung 73,6% và miền Nam là 60,2%.

3.3.1.1 Thực trạng sử dụng KS của đối tượng

Bảng 3.18. Thực trạng sử dụng kháng sinh của đối tượng trong vòng 3 tháng trước thời điểm nghiên cứu theo 3 miền (n=1432)

Đặc điểm	Tổng (n=1432)	Miền Bắc (n=796)	Miền Trung (n=337)	Miền Nam (n=299)	Giá trị p
Sử dụng kháng sinh					<0,001
Không	895 (62,5%)	463 (58,2%)	243 (72,1%)	189 (63,2%)	
Có	537 (37,5%)	333 (41,8%)	94 (27,9%)	110 (36,8%)	
Số lần sử dụng kháng sinh (Trung bình ± SD)	3,5 ± 4,0	2,2 ± 2,1	1,9 ± 1,2	8,5 ± 5,8	<0,001
Số ngày sử dụng kháng sinh trong lần điều trị gần nhất (n = 259)					<0,001
Dưới 5 ngày	46 (17,8%)	16 (11%)	1 (1,79%)	29 (50%)	
Từ 5-7 ngày	198 (76,4%)	119 (82,1%)	51 (91,1%)	28 (48,3%)	
Trên 7 ngày	15 (5,8%)	10 (6,9%)	4 (7,14%)	1 (1,7%)	

Thực trạng có sử dụng kháng sinh của người bệnh trong vòng 3 tháng là khá phổ biến và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các miền, miền Bắc có tỷ lệ sử dụng kháng sinh cao nhất (41,8%), tiếp đó là miền Nam (36,8%) và miền Trung có tỷ lệ thấp nhất (27,9%). Số lần trung bình là 3.5 lần trong 3 tháng. Đa phần người sử dụng kháng sinh trong khoảng thời gian từ 5-7 ngày (chiếm 76,4%). Mặc dù tỷ lệ mua theo đơn của bác sĩ được báo cáo là cao trong nghiên cứu này (70%), tuy nhiên vẫn còn tỷ lệ 30% người sử dụng kháng sinh không theo đơn của bác sĩ, trong đó có 3,7% sử dụng đơn thuốc thừa của người khác.



Biểu đồ 3.14. Cách thức sử dụng kháng sinh theo 3 miền (n = 259; p<0,001)

Tỷ lệ sử dụng không theo đơn của bác sĩ khác nhau giữa các miền, cao nhất là ở miền Nam (42,7%), tiếp đến là Miền Trung (24,5%) và miền Bắc có 21,3%, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.19. Thực trạng sử dụng kháng sinh của gia đình đối tượng trong vòng 3 tháng trước nghiên cứu theo 3 miền (n=1432)

Đặc điểm	Tổng (n=1432)	Miền Bắc (n=796)	Miền Trung (n=337)	Miền Nam (n=299)	Giá trị p
Sử dụng KS					<0,001
Không sử dụng	231 (16,1%)	57 (7,2%)	93 (27,6%)	81 (27,1%)	
Có sử dụng	1201 (83,9%)	739 (92,8%)	244 (72,4%)	218 (72,9%)	
Thời gian sử dụng kháng sinh trung bình 1 lần trong 1 đợt điều trị					<0,001
< 3 ngày	146 (12,2%)	39 (5,3%)	43 (17,6%)	64 (29,4%)	
3-7 ngày	1016 (84,6%)	682 (92,3%)	199 (81,6%)	135 (61,9%)	
> 7 ngày	39 (3,3%)	18 (2,4%)	2 (0,8%)	19 (8,7%)	
Thành viên hay sử dụng kháng sinh nhất					<0,001
Trẻ em	642 (44,8%)	479 (60,2%)	93 (27,6%)	70 (23,4%)	

Đặc điểm	Tổng (n=1432)	Miền Bắc (n=796)	Miền Trung (n=337)	Miền Nam (n=299)	Giá trị p
Người lớn	554 (38,7%)	210 (26,4%)	185 (54,9%)	159 (53,2%)	
Người già	147 (10,3%)	78 (9,8%)	31 (9,2%)	38 (12,7%)	
Không biết/ Không nhớ	89 (6,2%)	29 (3,6%)	28 (8,3%)	32 (10,7%)	
Triệu chứng/bệnh cần sử dụng kháng sinh					
Cúm (hắt hơi, sổ mũi, đau người)	565 (39,5%)	278 (49,2%)	172 (30,4%)	115 (20,4%)	<0,001
Đau cơ/xương/khớp	146 (10,2%)	69 (47,3%)	48 (32,9%)	29 (19,9%)	0,017
Sốt	506 (35,3%)	210 (41,5%)	137 (27,1%)	159 (31,4%)	<0,001
Đau bụng	131 (9,2%)	63 (48,1%)	47 (35,9%)	21 (16,0%)	0,002
Các bệnh nhiễm trùng	993 (69,3%)	594 (59,8%)	163 (16,4%)	236 (23,8%)	<0,001
Khác (chấn thương, viêm phế quản, v.v)	76 (5,3%)	44 (57,9%)	21 (27,6%)	11 (14,5%)	0,33
Người thường đưa ra quyết định sử dụng kháng sinh					<0,001
Bác sĩ tại trạm	1047 (73,1%)	646 (81,2%)	218 (64,7%)	183 (61,2%)	
Người bán thuốc	323 (22,6%)	124 (15,6%)	98 (29,1%)	101 (33,8%)	
Gia đình hoặc tự quyết định	62 (4,3%)	26 (3,3%)	21 (6,2%)	15 (5,0%)	

Nghiên cứu thực hiện khảo sát về thực hành sử dụng kháng sinh của gia đình trong 3 tháng. Kết quả cho thấy mức độ sử dụng kháng sinh trong gia đình là khá thường xuyên, 83,9% gia đình có sử dụng kháng sinh. Đặc điểm sử dụng kháng sinh này khác biệt rõ ràng giữa các miền và có ý nghĩa thống kê. Miền Bắc

có tỷ lệ sử dụng kháng sinh cao nhất (92,8%), trong khi miền Trung và miền Nam là tương đương, lần lượt là 72,4% và 72,9%.

Ở tỷ lệ chung, người hay phải sử dụng kháng sinh nhất trong gia đình là trẻ em với 44,8% tuy nhiên đặc điểm này không giống nhau ở các miền. Trong khi miền Bắc chủ yếu là trẻ em sử dụng kháng sinh chiếm 66,2% thì miền Trung và miền Nam tỷ lệ này chỉ là 27,6% và 23,4%. Thay vào đó tỷ lệ này ở người lớn miền Trung và miền Nam là 54,9% và 53,2%, miền Bắc chỉ có 26,4% người lớn trong gia đình sử dụng kháng sinh trong 6 tháng qua.

Việc sử dụng kháng sinh để điều trị nhiều triệu chứng khác nhau. Phổ biến nhất trong gia đình vẫn dùng để điều trị cho các bệnh nhiễm trùng. 69,3% số người được hỏi trả lời gia đình sử dụng để điều trị cho điều trị các bệnh nhiễm trùng, tuy nhiên tỷ lệ này ở miền Bắc là 59,8% cao hơn hẳn so với miền Trung (16,4%) và miền Nam (23,8%). Tuy nhiên có một tỷ lệ cao (39,5%) số người được hỏi trả lời gia đình sử dụng kháng sinh để điều trị các triệu chứng hắt hơi, sổ mũi, đau người.

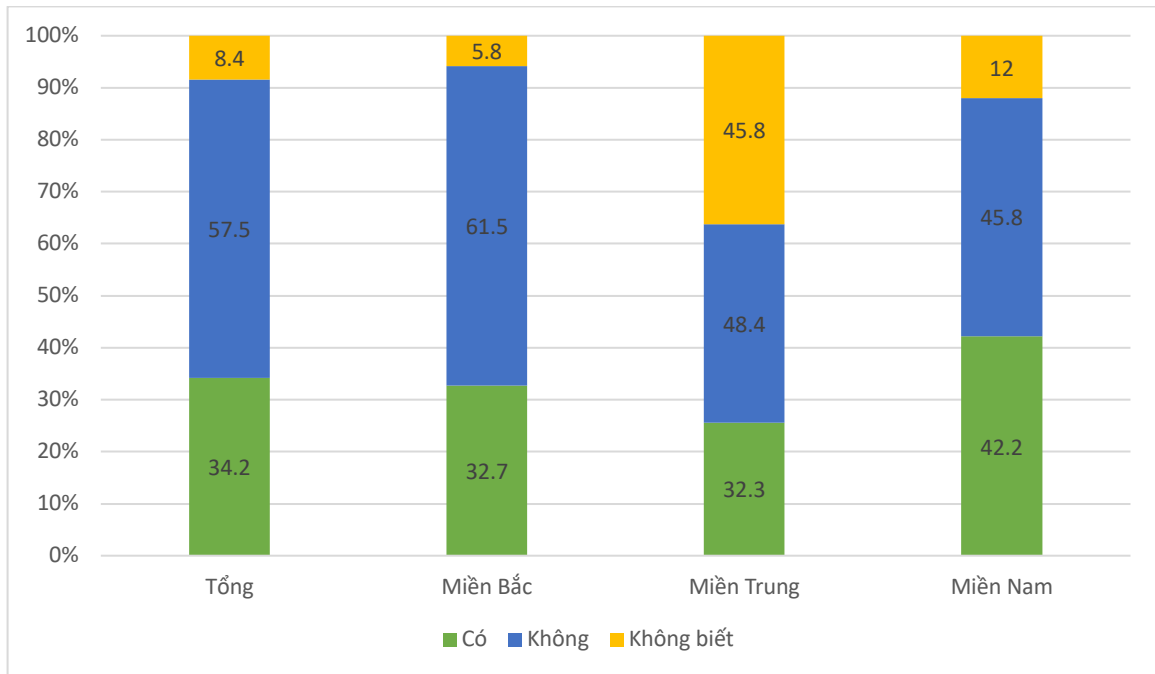
Trong việc sử dụng kháng sinh, 73,1% người sử dụng kháng sinh cho biết là do bác sỹ tại trạm y tế chỉ định, còn lại là do người bán thuốc ở hiệu thuốc (22,6%) và 4,3% người dùng tự quyết định.

3.3.2. Thực trạng sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi

Bảng 3.20. Thực trạng sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi theo 3 miền (n=1432)

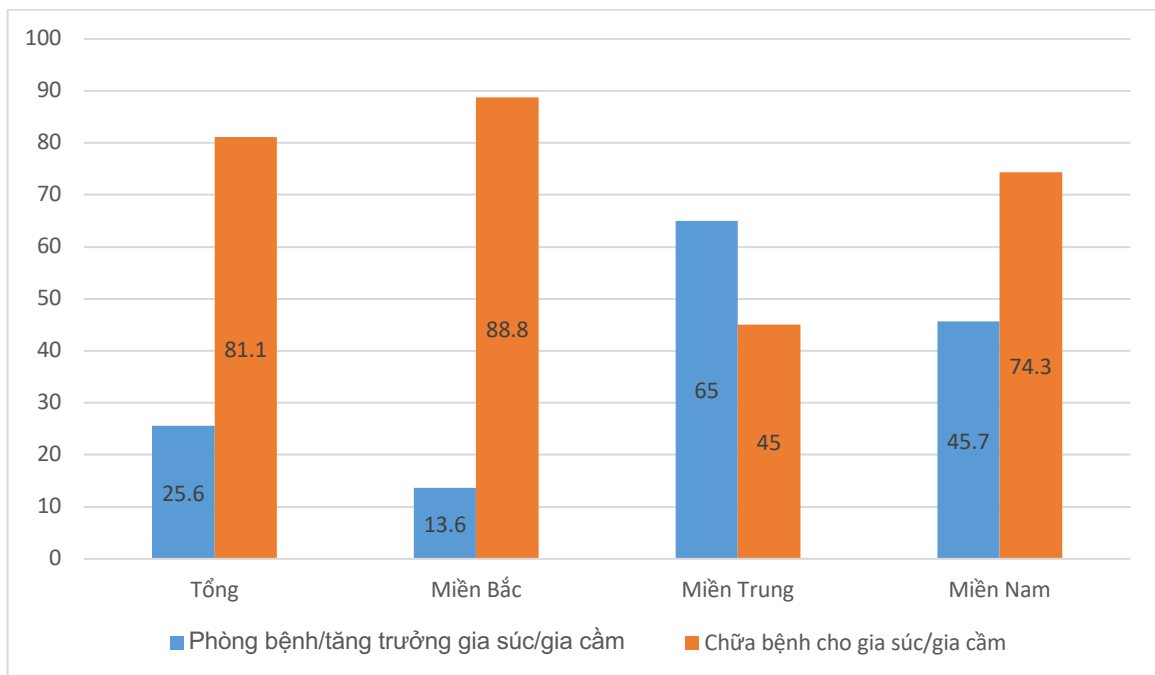
Đặc điểm	Tổng (n=1432)	Miền Bắc (n=796)	Miền Trung (n=337)	Miền Nam (n=299)	Giá trị p
Chăn nuôi gia súc					<0,001
Có	527 (36,8%)	382 (48%)	62 (18,4%)	83 (27,8%)	
Không	905 (63,2%)	414 (52%)	275 (81,6%)	216 (72,2%)	
Sử dụng thức ăn công nghiệp					<0,001
Có	210 (39,8%)	136 (35,6%)	23 (37,1%)	51 (61,4%)	
Không	317 (60,2%)	246 (64,4%)	39 (62,9%)	32 (38,6%)	

Trong nhóm đối tượng nghiên cứu, 36,8% số người được hỏi trả lời gia đình họ có chăn nuôi gia súc, gia cầm và trong số đó có 34,2% sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi.



Biểu đồ 3.15. Tỷ lệ sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi

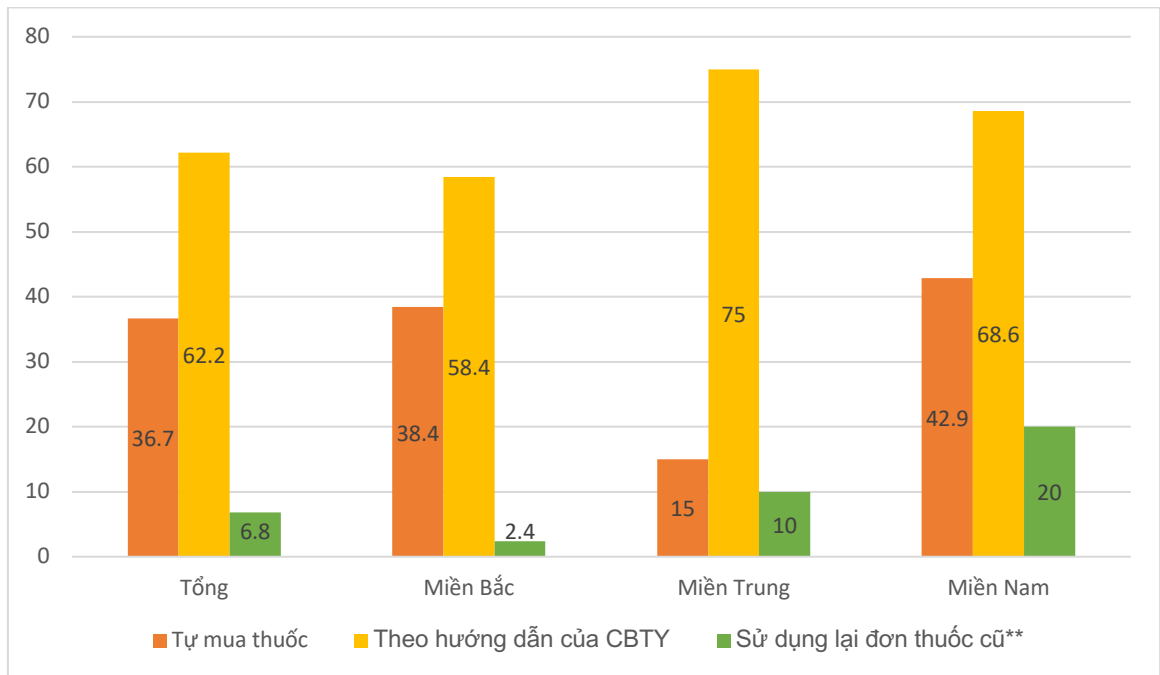
Tỷ lệ sử dụng KS trong chăn nuôi ở miền Nam (42,2%) cao hơn so với miền Bắc (32,7%) và miền Trung.



Biểu đồ 3.16. Mục đích sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi

81,1% số họ trả lời mục đích sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi là để chữa bệnh cho gia súc/gia cầm và 25,6% trong số họ trả lời để phòng bệnh và tăng

trường. Các yếu tố này đều có sự khác biệt theo vùng miền và có ý nghĩa thống kê.



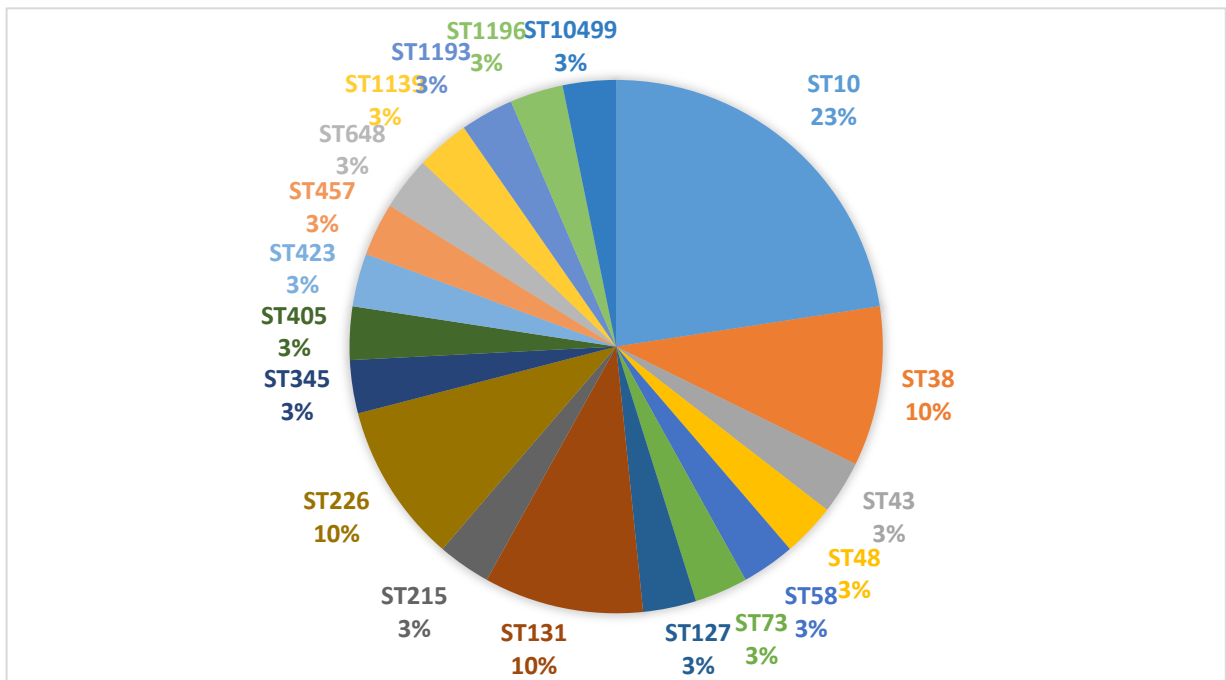
Biểu đồ 3.17. Cách thức sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi. () $p < 0,001$**

Đa phần trong số họ có sử dụng kháng sinh theo hướng dẫn của cán bộ thú y, tuy nhiên vẫn có một tỷ lệ không nhỏ tự mua thuốc (36,7%) và sử dụng lại đơn cũ (6,8%). Việc sử dụng đơn cũ ở miền Nam có tỷ lệ cao hơn nhiều (20%) so với miền Trung (10%) và miền Bắc chỉ có 2,4%.

3.4. Mối liên quan về kiểu gen giữa các chủng vi khuẩn phân lập được từ nghiên cứu và với các chủng đang lưu hành.

3.4.1. Mối liên quan về kiểu gen giữa các chủng *E. coli* phân lập được của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã và với các chủng đang lưu hành.

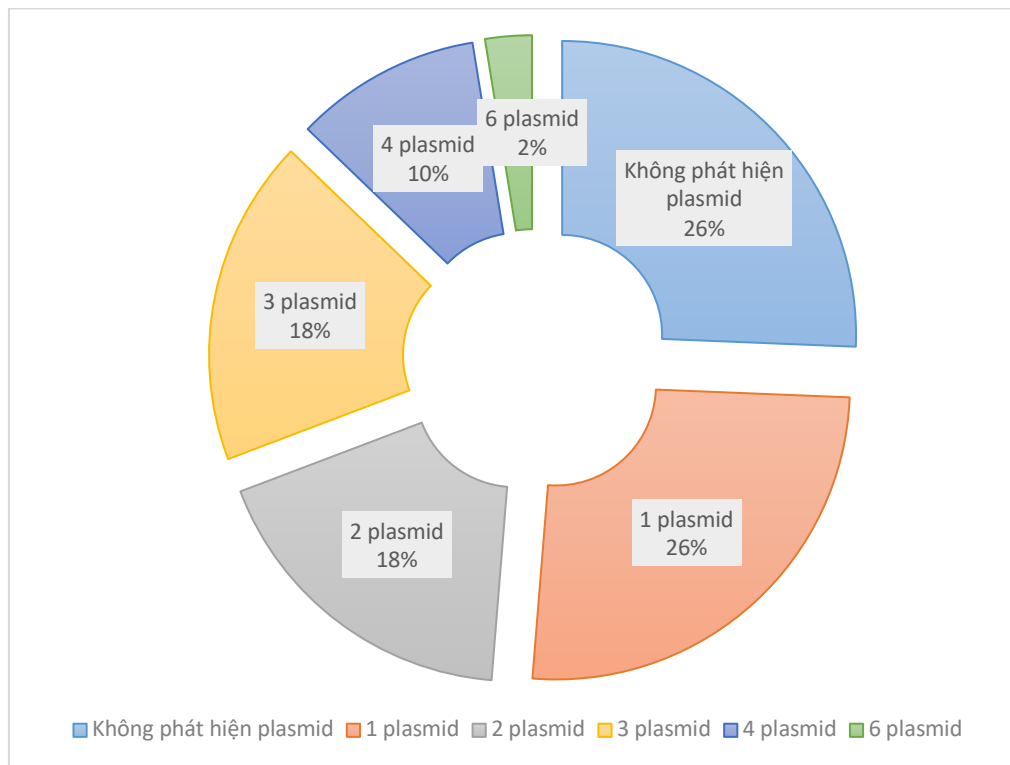
3.4.1.1.1. Đặc điểm Sequence types (STs)



Biểu đồ 3.18. Sự đa dạng STs của chủng *E. coli*

Trong 40 chủng phân tích NGS, chúng tôi xác định được 19 STs khác nhau, có mặt ở 31 chủng. Trong đó ST10 chiếm đa số 23% (7/31 chủng), tiếp theo đó là ST38 và ST226 chiếm 10%, còn lại là các ST43, ST48, ST58, ST73, ST127, ST131, ST215, ST226, ST345, ST405, ST457, ST423, ST457, ST648, ST1139, ST1193, ST1196, ST10499.

3.4.1.2 Phân tích đặc điểm plasmid của các chủng *E. coli* phân lập được



Biểu đồ 3.19. Số lượng plasmid của các chủng *E. coli* phân lập được

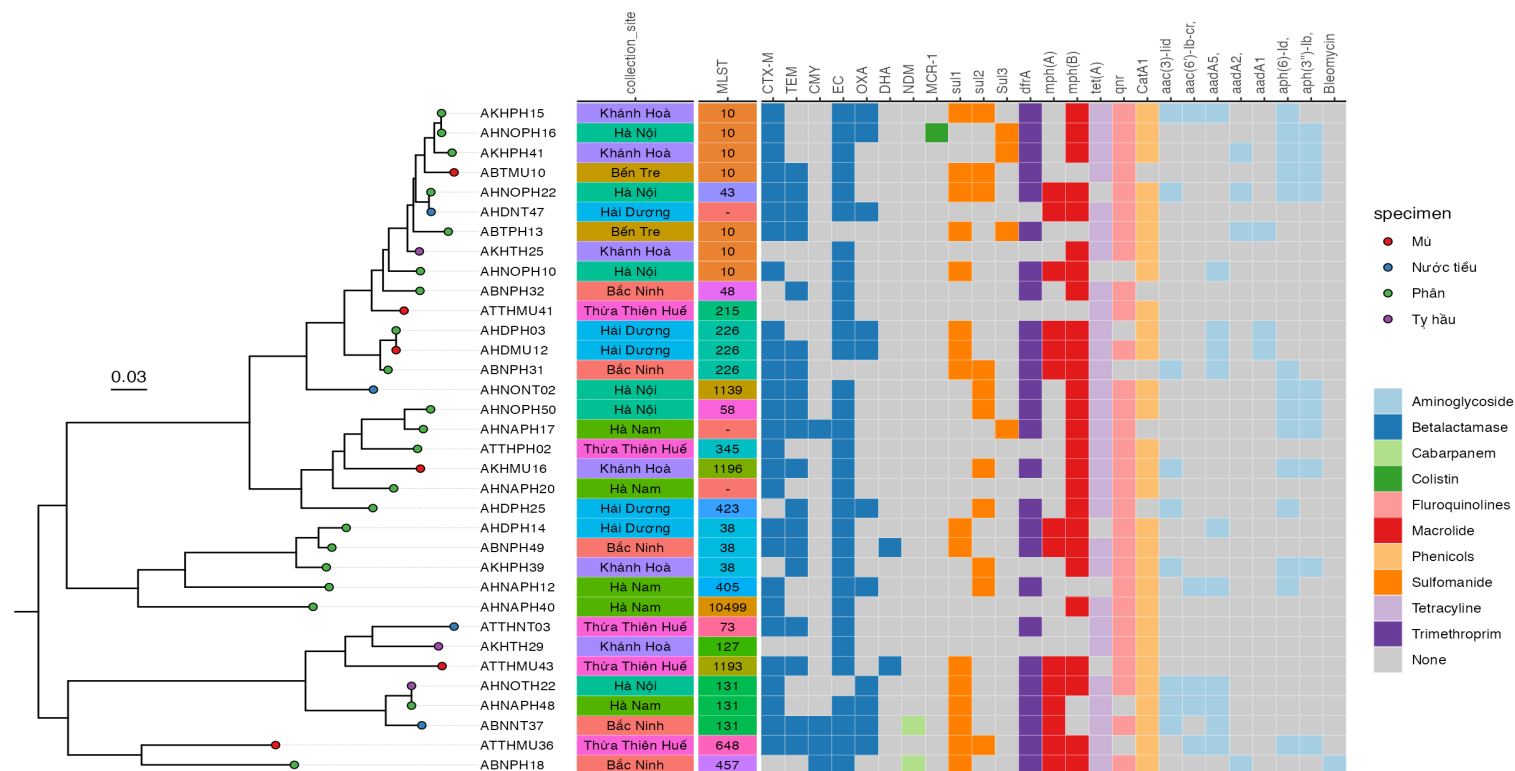
Trong 40 chủng *E. coli* được phân tích NGS đã phát hiện sự có mặt của tổng số 67 plasmid khác nhau ở 74% số chủng. Số lượng plasmid có mặt ở các chủng khác nhau, có 26% số chủng có 1 plasmid, 18% số lượng chủng có 2 và 3 plasmid, 10% số chủng mang 4 plasmid và có những chủng mang 6 plasmid, 2%.

Bảng 3.21. Loại plasmid và số lượng plasmid xuất hiện trong các chủng *E. coli*

STT	Loại plasmid	Số lượng	Tỷ lệ %
1.	Col(BS512)	3	4,48%
2.	Col156	7	10,45%
3.	Col440II	1	1,49%
4.	ColpVC	1	1,49%
5.	IncB/O/K/Z	2	2,99%
6.	IncFIA	9	13,43%
7.	IncFIA(HI1)	1	1,49%
8.	IncFIB(AP001918)	12	17,91%
9.	IncFIB(K)	2	2,99%
10.	IncFIB(pLF82)	1	1,49%

STT	Loại plasmid	Số lượng	Tỷ lệ %
11.	IncFII	7	10,45%
12.	IncFII(29)	1	1,49%
13.	IncFII(pHN7A8)	1	1,49%
14.	IncFII(pRSB107)	2	2,99%
15.	IncHI1A	1	1,49%
16.	IncHI1B(R27)	1	1,49%
17.	IncI	2	2,99%
18.	IncI1	2	2,99%
19.	IncI2	1	1,49%
20.	repA	1	1,49%
21.	IncY	3	4,48%
22.	IncX4	1	1,49%
23.	p0111	2	2,99%
24.	IncQ1	3	4,48%
Tổng		67	100%

Có 24 loại plasmid xuất hiện ở các chủng phân tích, trong đó plasmid IncFIB(AP001918) chiếm đa số 17,91%, tiếp sau đó là nhóm plasmid IncFIA (13,43%), Col156 (10,45%), IncFII (10,45%). Nhóm plasmid Col(BS512), IncY, IncQ1 đều có mặt ở 3% số chủng. Ngoài ra còn có mặt 17 loại plasmid khác.



Biểu đồ 3.20. Cây phát sinh loài thể hiện mối liên hệ về mặt di truyền của các chủng nghiên cứu và biểu đồ nhiệt thể hiện kiểu gen của các chủng *E. coli* mang gen sinh ESBLs phân lập

Chú giải: Mỗi chấm nhỏ hình tròn là một chủng vi khuẩn, có màu tương ứng với mã màu quy định cho loại bệnh phẩm. Thông tin về gen kháng, ST, địa phương thu thập mẫu của mỗi chủng được thể hiện ở 4 cột bên cạnh.

Sơ đồ cây phát sinh loài cho thấy các chủng nghiên cứu chia thành hai nhóm chính: nhóm phía trên - Biểu đồ 3.20 bao gồm 26 chủng thuộc 13 STs, trong đó có các ST phổ biến như ST10, ST226, ST38; nhóm còn lại nằm ở phía dưới - Biểu đồ 3.20 có 8 chủng thuộc 6 St khác nhau là ST73, ST 127, ST1193, ST131, ST646, ST457. Phân tích cây phát sinh loài dựa trên các gen cốt lõi đã chỉ ra mối liên hệ gần gũi giữa các chủng *E.coli* phân lập được từ các loại mẫu bệnh phẩm khác nhau và từ các

khu vực địa lý khác nhau: ST10 được phân lập từ mủ, phân và tỵ hầu từ 3 tỉnh thành phố khác nhau: Hà Nội, Khánh Hòa, Bến Tre.; ST226 phân lập từ mẫu bệnh phẩm phân và mủ tại Hải Dương, Bắc Ninh; ST38 phân lập từ mẫu phân trên cả 3 tỉnh Hải Dương, Bắc Ninh, Khánh Hòa; ST131 phân lập trên 3 loại mẫu phân, nước tiểu, tỵ hầu tại 3 tỉnh Thừa Thiên Huế, Hà Nội, Hà Nam.

Tổng số 40 chủng nghiên cứu đều có mang gen kháng với các nhóm kháng sinh khác nhau bao gồm nhóm kháng sinh Aminoglycoside, Betalactamase, Cabarpenem, Colistin, Fluroquinolones, Macrolide, Phenicols, Sulfonamide, Tetracycline, Trimethoprim. Phần lớn các chủng đều có mang gen sinh ESBL CTX-M, TEM, EC, OXA. Có 02 chủng phân lập tại Bắc Ninh trên mẫu bệnh phẩm phân và nước tiểu có mang gen NDM (ABNPH18 và ABNNT37) và 01 chủng phân lập trên mẫu phân tại Hà Nội có mang gen mcr-1.

Trong các chủng phân lập được từ các địa phương, có một chủng có cùng ST như ST10, ST225, ST38 và ST131 xuất hiện ở các điểm nghiên cứu. Có một số chủng khá tương đồng nhau về kiểu gen kháng thuốc, bao gồm cả cùng địa điểm (AHDPH03 và AHDMU12) và khác địa điểm nghiên cứu như 2 chủng tại Khánh Hòa và Hà Nội AKHPH15 và AHNOPH16 hay AHNOTH22 và AHNPH48..

3.4.2. Mối liên quan về kiểu gen giữa các chủng *Klebsiella* spp. phân lập được của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã và với các chủng đang lưu hành

Bảng 3.22. Đặc điểm các gen KKS ở các chủng *Klebsiella* spp. phân tích bằng kỹ thuật giải trình tự hệ gen (NGS)

Isolate ID	Gen Efflux pump	Gen mã hoá sinh Carbapenemase- and ESBL	Gen kháng trimethoprim+sulfonamides	Gen kháng macrolide	Gen kháng tetracycline	Gen kháng fluoroquinolones	Kháng phenicols	Gen mã hoá Aminoglycoside acetyltransferase	MLST	Plasmid
ABN-PH33	OqxA, OqxB, fosA6	blaCTX-M-15, blaSHV-100, blaOXA-9, blaNDM-4	dfrA27, sul1, sul2	mph(A)	tet(A)	qnrS1, qnrB6, qacE, qacE	-	aac(6')-Ib-cr, aadA16, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, ARR-3, aadA1	-	IncFIB(K)(pC AV1099-114), IncHI1B(pND M-MAR), IncFII(K)
ABN-PH34	OqxA, OqxB	blaCTX-M-15, blaSHV-100, blaOXA-9, blaNDM-4,	dfrA27, sul1, sul2	mph(A)	tet(A)	qnrS1, qnrB6, qacE	-	aac(6')-Ib-cr, aadA16, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, ARR-3, aadA1	-	IncFIB(K)(pC AV1099-114), IncHI1B(pND M-MAR), IncFII(K)
AHN OPH17	OqxA, OqxB, fosA6	blaSHV-80, blaDHA-1	dfrA1, sul1	-	tet(A)	qacE, qnrS1	-	-	ST1886	IncR
AKHP H31	OqxA, OqxB, fosA5	blaSHV-78, blaDHA-1	sul1	-	-	qacE, qnrB4	catA1, catB3	aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, ARR-3	-	IncFIB(K), IncFII(K), IncR,

										IncFIB(pNDM-Mar)
ATTH - MU39	OqxA, OqxB, rmtB	blaSHV-67, blaTEM-1B, blaNDM-4,	sul2	-	-	qnrB1, qepA1	-	aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, rmtB	ST273	IncFIB(K)
ATTH - MU48	OqxA, OqxB, fosA6,	blaCTX-M-14, blaCTX-M-15, blaLAP-2, blaOXA-9, blaNDM-4,	dfrA14, dfrA27, sul1	-	tet(D)	qacE, floR	-	aac(3)-Iid, aadA1, ARR-3, aac(6')-Ib-cr, aadA16	ST15	IncFIA(HI1), IncR, ColRNAI
ATTH -NT30	OqxA, OqxB, fosA6,	blaCTX-M-14, blaLAP-2, blaSHV-100, blaOXA-9, blaNDM-4,		-		qnrS1	-	aac(3)-Iid, aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib, aadA1	ST15	IncFIB(K), IncFII(K)
ACT-PH36	-	-		-	-	-	-	-	ST121	
ACTN T44	OqxA, OqxB	blaSHV-148, blaOXA-181	-	-	-	qnrS1	-	-	ST16	ColKP3, IncX3, IncFIB(K)

Phân tích NGS của 9 vi khuẩn *Klebsiella spp.* cho thấy toàn bộ 8 *K.pneumoniae* đều mang nhiều gen kháng kháng sinh, 01 vi khuẩn *K.aerogenes* không mang gen bất kỳ gen kháng nào. Các gen kháng đa dạng ở tất cả các kháng sinh bao gồm của các nhóm gen mã hoá sinh ESBLs (8/8) và carbapenem (5/8). Các gen chiếm tỷ lệ cao bao gồm gen *bla*CTX-M-14, CTX-M-15, *bla*SHV, NDM-4 và gen mã hoá aminoglycoside acetyl transfer, gen kháng fluoroquinolones.

3.2.3.4. Phân tích đặc điểm plasmid của các chủng *Klebsiella spp.* phân lập được

Bảng 3.23. Đặc điểm plasmid của các chủng *Klebsiella spp.*

STT	Loại plasmid	Số lượng	Tỷ lệ
1.	ColKP3	1	4,55%
2.	ColRNAI	1	4,55%
3.	IncFIA(HI1)	1	4,55%
4.	IncFIB(K)	4	18,18%
5.	IncFIB(K)(pCAV1099-114)	2	9,09%
6.	IncFIB(pNDM-Mar)	1	4,55%
7.	IncFII(K)	6	27,27%
8.	IncHI1B(pNDM-MAR)	2	9,09%
9.	IncR	3	13,64%
10.	IncX3	1	4,55%

Các plasmid của các chủng *Klebsiella spp.* đang dạng, trong đó IncFII(K) có tần suất xuất hiện nhiều nhất 27,27%, tiếp đến là IncFIB(K) 18,18% và IncR là 13,64%.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *E.coli* và *Klebsiella spp.*

4.1.1. Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *E.coli*

4.1.1.1 Đặc điểm mang gen kháng của vi khuẩn *E.coli*

Điều tra tỷ lệ kháng thuốc kháng của vi khuẩn *E.coli* mang gen mã hoá sinh ESBLs có tầm quan trọng lớn trong cả việc tạo ra các chiến lược điều trị và đánh giá các hướng dẫn hiện có. Tần suất và các loại nhiễm trùng do *Enterobacteriaceae* sinh ESBLs đã tăng lên đáng kể trong vài thập kỷ qua với sự chênh lệch giữa các địa điểm và quốc gia khác nhau. Kể từ đầu thiên niên kỷ mới, *E. coli* đã trở thành loại vi khuẩn sinh ESBLs được phân lập phổ biến nhất trên toàn thế giới với CTX-M là loại phân lập được thường xuyên nhất [85]. *E. coli* sinh ESBL bùng phát gây thêm gánh nặng lớn cho điều trị nhiễm khuẩn tiêu hoá và tiết niệu khởi phát từ cộng đồng vì các chủng này thường đa kháng thuốc, làm tăng thất bại trong điều trị [159, 207]. Vì không có giám sát toàn diện về nhiễm trùng do *E. coli* mắc phải trong cộng đồng ở Việt Nam, nghiên cứu này nhằm đánh giá tỷ lệ hiện mắc và đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn này. Số liệu từ nghiên cứu này sẽ góp phần đưa ra bức tranh về thực trạng vi khuẩn *E. coli* kháng kháng sinh ở cộng đồng.

Tổng số 237 chủng *E. coli* phân lập, 136 chủng (57,3%) mang gen mã hoá sinh ESBLs (Biểu đồ 3.1). Tỷ lệ *E. coli* sinh ESBLs khác nhau giữa các địa phương khác nhau. Nghiên cứu của chúng tôi cho tỷ lệ nhiễm ESBLs cao hơn nghiên cứu từ Sudan năm 2013 với 30,2% sinh ESBLs ở *E. coli* [133]. Theo nghiên cứu của Hsueh cho thấy tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *E. coli* sinh ESBLs cao nhất ở Ấn Độ (60%), tiếp theo là Hồng Kông (48%) và Singapore (33%) [128]. Trong nghiên cứu của chúng tôi tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* sinh ESBLs ở Việt Nam cũng khác nhau giữa các miền, ở miền Nam (30%) tỷ lệ chỉ bằng một nửa so với miền Bắc (71,7%) và miền Trung (61,1%) (sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê $p < 0.05$). Các nghiên cứu trên từng địa phương riêng biệt cũng cho thấy tỷ lệ tương tự. Một nghiên cứu tại Thái Bình trên mẫu phân của người khoẻ mạnh, tỷ lệ này là 66,7% [13], trong khi tỷ lệ này tại nghiên cứu trên mẫu thu thập tại bệnh viện ở Bến Tre là 44,4% [4]. Đây có thể là một gợi ý cho các nghiên cứu tiếp theo để tìm hiểu sâu hơn về lý do dẫn đến sự khác nhau này.

Trong đó tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen mã hoá sinh ESBLs ở các bệnh phẩm khác nhau là khác nhau, tỷ lệ cao nhất ở vi khuẩn *E.coli* trên mẫu bệnh phẩm của triệu chứng tiêu chảy (72,1%), sau đó đến nhiễm khuẩn tiết niệu (22,1%), nhiễm khuẩn da (5,1%) và viêm phổi (0,7%). Tại Việt Nam, các nghiên cứu về vi khuẩn *E. coli* kháng kháng sinh ở cộng đồng chưa có nhiều, chỉ có một vài nghiên cứu về vi khuẩn *E. coli* ở trên mẫu phân của người khoẻ mạnh. Một nghiên cứu tại Thái Bình năm 2016 cho thấy tỷ lệ mang gen mã hoá sinh ESBLs ở trên mẫu phân của người khoẻ mạnh là 64,6%, khá tương đồng với kết quả nghiên cứu này [246]. *E. coli* gây nhiễm khuẩn tiết niệu và sinh ESBLs cũng đang là vấn đề đáng quan tâm, tỷ lệ vi khuẩn *E.coli* sinh ESBLs ở nhiễm khuẩn tiết niệu cộng đồng tăng ở mức độ toàn cầu. Tuy nhiên rất ít nghiên cứu ở Việt Nam thực hiện trên mẫu nước tiểu ở người bệnh có triệu chứng nhiễm khuẩn tiết niệu. Ở nghiên cứu này tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* tìm thấy ở mẫu bệnh phẩm nhiễm khuẩn tiết niệu là 25,3% trong đó tỷ lệ vi khuẩn *E.coli* sinh ESBLs là 22,1%.

Từ nhiều nghiên cứu khác nhau, người ta nhận thấy rằng gen mã hoá sinh ESBLs rất đa dạng. Các báo cáo trước đó đã đề cập rằng loại gen mã hoá ESBLs phổ biến nhất là SHV, TEM và CTX-M. Trong thập kỷ qua, các loại TEM và SHV được báo cáo là các loại gen β -lactamase phổ biến nhất, nhưng gần đây, loại CTX-M đã phổ biến trên toàn thế giới so với các kiểu gen SHV [186]. CTX-M chiếm ưu thế ở nhiều vùng; một số báo cáo được thực hiện từ Iran (74%) [155], Maroc, Bắc Phi (70%) [186, 231] và Ấn Độ (93,7%). Tuy nhiên, nghiên cứu hiện tại đã chỉ ra rằng gen TEM là gen chiếm ưu thế trong vi khuẩn *E.coli* mang gen kháng, đã được chứng thực với các báo cáo của một số nghiên cứu khác trước đó [168, 142, [31, 186, 231]. Gen TEM chiếm ưu thế ở các nước châu Âu như Ý (45,4%) và Thổ Nhĩ Kỳ (72,7%) [54]. Nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như các nghiên cứu này TEM chiếm ưu thế (88,2%), sau đó là CTX-M (51%) (Biểu đồ 3.3).

Một số nghiên cứu đã báo cáo sự đồng tồn tại của các gen mã hoá sinh ESBLs khác nhau trong cùng các dòng phân lập. Sự đồng tồn tại chính của cả hai gen là CTX-M và TEM (41,8%) (Biểu đồ 3.4) trong các dòng phân lập của chúng tôi. Kết quả này cũng phù hợp với những nghiên cứu khác [243] ở Iran và ở Ấn Độ [245] đã báo cáo cả TEM và CTX-M là loại phổ biến nhất.

Khi phân tích qua giải trình tự toàn bộ hệ gen của vi khuẩn *E.coli* cho thấy các vi khuẩn phân lập ở cộng đồng mang rất nhiều các gen kháng các nhóm kháng sinh khác nhau và có tỷ lệ các gen này tương đối cao bao gồm Tetracycline, Sulphonamide, trimethoprim, aminoglycoside đều cao hơn 60% (Biểu đồ 3.8). Kết quả này cũng tương đồng với một số nghiên cứu vi khuẩn *E.coli* phân lập từ nhiễm khuẩn cộng đồng của một số nước như Uganda [135], Nam Á và các nước châu Phi cận Sahara [134] và Việt Nam [198]. Tuy nhiên ở những nghiên cứu này không có sự xuất hiện của các gen NDM, kháng với carbapenem hay mcr-1 kháng với colistin. Điều này tiếp tục chứng minh sự lan truyền phức tạp các gen kháng với các loại kháng sinh dùng trong bệnh viện và những kháng sinh cuối cùng còn hiệu quả để điều trị các nhiễm khuẩn đa kháng tại bệnh viện tại Việt Nam.

4.1.1.2 Thực trạng kháng với các loại kháng sinh của *E.coli* phân lập được

Vi khuẩn *E.coli* kháng với các loại kháng sinh phổ biến thường dùng từ nghiên cứu của chúng tôi được thể hiện tại Biểu đồ 3.5, trong đó 92,3% kháng với ampicilin, 21,9% kháng với amoxicillin/acid clavulanic; với nhóm kháng sinh cephalosporin phổ rộng, 72,1% kháng với cefotaxim và 23,1% kháng và 20,2% trung gian với ceftazidime. Tỷ lệ kháng với kháng sinh nhóm Quinolon thế hệ 2 ciprofloxacin cũng ở mức 38,5% và 16,3% ở trung gian. Với nhóm sulfamid, tỷ lệ kháng khá cao ở mức 55,2% với kháng sinh kết hợp sulfamethoxazol+trimethoprim. Với nhóm aminoglycoside, 28,8% kháng với gentamicin. Kết quả này thấp hơn so với các nghiên cứu tương tự tại Trung Quốc của các tác giả Miao, Devi và cộng sự trên các chủng nhiễm khuẩn khởi phát tại cộng đồng [97, 183]. Tuy nhiên so với các nghiên cứu tương đồng ở các quốc gia khác ngoài Trung Quốc thì kết quả kháng với các loại kháng sinh ở nghiên cứu này của chúng tôi lại cao hơn nhiều, kể cả các quốc gia có thu nhập thấp ở Châu Á và Châu Phi. Nghiên cứu tổng hợp này cho thấy, 65% chủng phân lập kháng ampicillin, 67% với trimethoprim, 66% với trimethoprim/sulphamethoxazole. Khả năng kháng với các aminoglycoside khác được thử nghiệm là rất hiếm (3%). Tình trạng kháng fluoroquinolon tương đối không thường xuyên, 17% kháng với norfloxacin và 8,4% kháng với cả norfloxacin và ciprofloxacin. Trong số các kháng sinh nhóm β -lactam, kháng ampicillin là phổ biến (65%), nhưng kháng ceftriaxone (3%), ceftazidime (3%) và cefepime (2%) là rất hiếm [134]. Trong khi đó, nghiên cứu các chủng nhiễm khuẩn từ cộng đồng tại Hàn Quốc của tác giả

Kim và cộng sự cho thấy tỷ lệ thấp hơn rất nhiều. 30,2% kháng ciprofloxacin. Trimethoprim/sulfamethoxazole và fosfomycin cho thấy tỷ lệ kháng thuốc tương tự như ciprofloxacin, lần lượt là 31,8 và 28,2% [143]. Tại nghiên cứu này của Hàn Quốc cho thấy trong số các chủng *E. coli* phân lập từ viêm bàng quang cấp không biến chứng, tỷ lệ nhạy cảm với các kháng sinh còn cao: 38,5% nhạy với ampicillin, 80,7% nhạy với amoxicillin/clavulanate, 67,3% nhạy với trimethoprim/sulfamethoxazole, 74,6% nhạy với ciprofloxacin, 77,5% với levofloxacin, 86,0% với cefazolin, 86,1% với cefazoli, 93,6% đối với cefpodoxime, 94,7% đối với ceftriaxone, 99,5% đối với amikacin, 80,9% đối với tobramycin và 76,6% đối với gentamicin. Tuy nhiên xu hướng kháng ciprofloxacin ngày càng tăng (24,8%) so với các nghiên cứu tương tự năm 2006 (23,4%).[247]

Kết quả từ nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy cao hơn rất nhiều so với các nghiên cứu tại các quốc gia phát triển. Nghiên cứu tổng hợp của tác giả Bryce và cộng sự cho thấy, trong các nghiên cứu từ các nước OECD, tỷ lệ kháng thuốc chung là 53,4% (khoảng tin cậy 95% 46,0% đến 60,8%) đối với ampicillin, 23,6% (13,9% đến 32,3%) đối với trimethoprim, 8,2% (7,9% đến 9,6%) đối với co-amoxiclav, và 2,1% (0,8 đến 4,4%) đối với ciprofloxacin; nitrofurantoin thấp nhất là 1,3% (0,8% đến 1,7%) [66].

Một nghiên cứu tại Pháp của tác giả Massot và cộng sự cho thấy, 29,7% số chủng đã kháng với amoxicillin và 16,1% với axit amoxicillin-clavulanic 23,3%, với nhóm aminoglycosid, số chủng đề kháng với streptomycin và chỉ 0,7% và 0,4% số chủng kháng với gentamicin, tobramycin và netilmicin tương ứng. 15,8% đối với cotrimoxazol và với cloramphenicolin 7,2% [176]. Cũng tương tự vậy, một nghiên cứu của tác giả Croxall và cộng sự tại Lôn Đôn trên cả bệnh viện và cộng đồng cho thấy mức độ đề kháng cao nhất được quan sát đối với ampicillin (45%), trimethoprim (41%), cefradine (26%) và ciprofloxacin (21%), có sự khác biệt nhẹ giữa mức độ kháng thuốc của bệnh viện và cộng đồng, khác biệt này không có ý nghĩa thống kê [92]. Một nghiên cứu tại Pháp cho của tác giả Ferjani và cộng sự tại Pháp cho thấy Tỷ lệ đề kháng cefotaxime (11,1%), ciprofloxacin (19%), amikacin (3,2%), và cotrimoxazole (42,8%) [106].

Vi khuẩn đa kháng thuốc (MDR) đã được công nhận là một trong những vấn đề sức khỏe cộng đồng quan trọng nhất hiện nay. Hiệp hội các bệnh truyền nhiễm của Hoa Kỳ công nhận tình trạng kháng thuốc kháng sinh là "một trong

những mối đe dọa lớn nhất đối với sức khỏe con người trên toàn thế giới"[44]. Một số vấn đề chính của sự nghiêm trọng do sự gia tăng của vi khuẩn MDR. Đầu tiên và quan trọng nhất là kết quả ở những người bệnh bị nhiễm bệnh với vi khuẩn MDR có xu hướng tồi tệ hơn so với những người bệnh bị nhiễm các sinh vật nhạy cảm hơn[274]. Tỷ lệ kháng kháng khuẩn tăng cao có tác động đến tất cả các khía cạnh của y học hiện đại và đe dọa làm giảm khả năng đạt được của nhiều thành tựu, chẳng hạn như chăm sóc ung thư, cấy ghép và các thủ thuật phẫu thuật[218]. Thứ hai, chi phí gia tăng lớn có liên quan đến những bệnh nhiễm trùng này. Tại Hoa Kỳ, chi phí chi trả thêm hàng năm liên quan đến nhiễm trùng do sinh vật kháng thuốc so với sinh vật nhạy cảm được ước tính từ 21 tỷ đến 34 tỷ USD[44]. Thứ ba, sự phổ biến của các vi khuẩn MDR cụ thể có liên quan chặt chẽ đến việc sử dụng kháng sinh phổ rộng, cả theo kinh nghiệm và điều trị có bằng chứng. Việc sử dụng gia tăng này dẫn đến tỷ lệ vi khuẩn MDR thậm chí còn cao hơn, do đó tạo ra một vòng luẩn quẩn.

Đa kháng là kháng với từ 3 loại kháng sinh hoặc nhiều hơn định nghĩa của CDC Hoa Kỳ [171]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ đa kháng của các chủng vi khuẩn *E.coli* phân lập được chọn để phân tích là 58,7% (61/104) (Bảng 3.6). Đây là một tỷ lệ khá cao so với các nghiên cứu trên các chủng từ nhiễm trùng cộng đồng. Nghiên cứu của tác giả Ukah và cộng sự trên phụ nữ nhiễm khuẩn tiết niệu tại cộng đồng của Canada cho thấy tỷ lệ này là 24,6% [262]. Trong khi một nghiên cứu tại Mỹ cho thấy tỷ lệ MDR trên người bệnh nhiễm trùng máu mắc tại cộng đồng là 31-36% và giảm vào mùa hè chỉ còn 11-14%[227]. Một nghiên cứu tại Đài Loan trên mẫu phân ở trẻ em cho thấy tỷ lệ này 37%. [129].

Kết quả này cũng cao hơn so với một số quốc gia đang phát triển. So với kết quả phân tích tổng hợp về *E.coli* kháng thuốc trên trẻ em của Châu Á và Châu Phi của tác giả Danielle và cộng sự công bố năm 2018, tỷ lệ MDR là hơn một nửa (52%) thấp hơn so với nghiên cứu của chúng tôi [134]. Tương tự đó là kết quả nghiên cứu tại Ấn Độ, Algeria, Uganda, tỷ lệ này lần lượt là 50%, 48,7%, 34%[178, 192, 290]. Tuy nhiên so với 1 số quốc gia có tình trạng kháng kháng sinh cao thì tỷ lệ của nghiên cứu này thấp hơn. Một nghiên cứu tại Nepal của tác giả Ansari và cộng sự trên 200 mẫu nhiễm trùng cộng đồng bao gồm cả 4 loại mẫu nước tiểu, mủ, máu và đờm cho thấy tỷ lệ MDR là 78% [47]. Nghiên cứu của

tác giả và cộng sự tại Iran trên nhiễm trùng nước tiểu tại cộng đồng cho kết quả tỷ lệ MDR là 64%. [174]

Thông thường, vi khuẩn MDR có liên quan đến các bệnh nhiễm trùng bệnh viện. Tuy nhiên, qua nghiên cứu này cũng góp phần cho thấy *E.coli* đa kháng đã trở thành nguyên nhân khá phổ biến của các bệnh nhiễm trùng mắc phải trong cộng đồng. Đây là một điểm quan trọng vì sự lây lan trong cộng đồng của vi khuẩn MDR dẫn đến sự gia tăng lớn dân số có nguy cơ, và sau đó là sự gia tăng số ca nhiễm trùng do vi khuẩn MDR. Đã có một số nghiên cứu nhất định xem xét các yếu tố nguy cơ, cơ chế lan truyền của vi khuẩn đa kháng thuốc bao gồm như tiếp xúc với dịch vụ chăm sóc sức khỏe, sự hiện diện của các thiết bị y tế trong nhà, chẳng hạn như ống thông tiểu, ống cho ăn, ống nội khí quản và đường mạch máu; trạng thái miễn dịch của cơ thể, chẳng hạn như những người được ghép tế bào gốc tạo máu hoặc cơ quan khác, và các tình trạng bệnh đi kèm khác, chẳng hạn như suy thận; đã từng sử dụng kháng sinh hoặc các yếu tố môi trường thuận lợi cho việc lan truyền vi khuẩn đa kháng [254, 265, 271]. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng có sự khác biệt lớn giữa các con đường lây lan vi khuẩn đa kháng thuốc giữa cộng đồng và bệnh viện do các cơ chế tiềm tàng khác nhau của vi khuẩn, đặc tính kháng của vi khuẩn[271]. Ngăn ngừa sự lây lan thêm của vi khuẩn MDR trong cộng đồng là một trong những thách thức sức khỏe cộng đồng cấp bách nhất. Không may rằng, dữ liệu quốc gia hoặc thậm chí khu vực về tính nhạy cảm với thuốc kháng sinh thường bị hạn chế. Ngoài ra, khi những dữ liệu này có sẵn ở một số hình thức, dữ liệu dịch tễ học kèm theo thường quá hạn chế để xác định những chủng phân lập nào thực sự có liên quan đến cộng đồng. Hơn nữa, thông tin lâm sàng nói chung là phần nổi của tảng băng chìm và để đủ thu hút sự chú ý của các nhà hoạch định chính sách. Do đó số liệu từ nghiên cứu của chúng tôi góp phần ban đầu về tỷ lệ vi khuẩn *E.coli* đa kháng thuốc tại cộng đồng. Cần tiếp tục các nghiên cứu theo dõi dọc tìm hiểu cơ chế lan truyền của vi khuẩn đa kháng thuốc tại cộng đồng và các yếu tố nguy cơ tại cộng đồng Việt Nam.

4.1.2. Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *Klebsiella* spp.

Klebsiella spp. là vi khuẩn Gram âm có mặt trên toàn cầu và là nguyên nhân gây nhiễm trùng bệnh viện, nhiễm trùng cộng đồng như áp xe gan, viêm phổi, nhiễm khuẩn tiết niệu. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ *Klebsiella* spp. phân lập được từ các mẫu thu thập được là 7,4%, cao nhất ở mẫu phân 18/51 và mẫu nước tiểu

là 14/51 ở mẫu mủ và tỷ hầu tỷ lệ thấp hơn. Đây cũng là một tỷ lệ cao so với các nghiên cứu trên các mẫu của người bệnh không nằm viện hoặc ở cộng đồng như nghiên cứu tại Nhật Bản (6,3%) [86], Ethiopia 5,7% [248], Tunisia là 5,2%, [175] và một nghiên cứu tại Trung Quốc tỷ lệ này chỉ là 0,5% [169] chủng *K.pneumoniae* phân lập được từ mẫu phân. Nghiên cứu cho thấy tỷ lệ *K.pneumoniae* chiếm đa số trong các chủng *Klebsiella* spp. phân lập được (chiếm 72,5%). Ngoài ra còn có các loài khác là *K.oxytoca*, *K.aerogenes*, *K.varicola*. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đây và trong y văn, tỷ lệ *K.pneumoniae* chiếm đa số. Nghiên cứu tại Mexico tỷ lệ *K.pneumoniae* là 36/39 chủng (92%) [112]. Một nghiên cứu ở Anh cho thấy tỷ lệ *K.pneumoniae* là 60%, *Klebsiella varicola* 13%, *Klebsiella oxytoca* 7%, *Klebsiella aerogenes* 4% [166]. Do tỷ lệ *K.pneumoniae* có mặt chủ yếu nên của *Klebsiella* spp. trong các nhiễm khuẩn bệnh viện và cộng đồng nên hầu hết các nghiên cứu tập trung vào tác nhân này [165, 221, 300]. Hơn 1/3 số chủng được phân lập từ mẫu phân (35,3%), 27,5% từ nước tiểu, 19,6% từ tỵ hầu và 17,6% từ dịch mủ. Tỷ lệ *Klebsiella* spp. phân lập từ các loại mẫu bệnh phẩm từ nghiên cứu này khá khác biệt so với các nghiên cứu khác. Một nghiên cứu tại Trung Quốc cho thấy tỷ lệ *Klebsiella* spp. phân lập chủ yếu từ mẫu đờm (73,9%) và nước tiểu 11,2% [300], trong khi số liệu từ giám sát tại Đài Loan cho thấy các chủng phân lập chủ yếu từ mẫu máu và mẫu nước tiểu [165]. Một nghiên cứu theo dõi dọc tại Ấn Độ cho thấy tỷ lệ phân lập chủng *E.coli* và *Klebsiella* spp. chủ yếu từ mẫu nước tiểu (91,1%), sau đó là từ mẫu đờm, mẫu mủ và mẫu phân chỉ chiếm (0,7%) [97].

4.1.2.1 Thực trạng mang gen kháng kháng sinh của vi khuẩn *Klebsiella* spp.

Nghiên cứu này đã minh họa các đặc điểm dịch tễ học và di truyền của ESBL-Kp gây nhiễm trùng khởi phát tại cộng đồng tại 8 địa điểm của Việt Nam. Kết quả của chúng tôi cho thấy tỷ lệ mang gen sinh ESBLs tại các chủng thu thập từ khởi phát tại cộng đồng là 41/51 (80,4%) (Bảng 3.11). Đây là một tỷ lệ thực sự cao so với các nghiên cứu trên cộng đồng tại các quốc gia khác như Đài Loan là 11,9% năm 2012, Mỹ là 7,2% năm 2009-2011 [62, 165]. Điều này làm dấy lên lo ngại rằng *Klebsiella* spp. mang gen kháng kháng sinh phổ biến trong cộng đồng đã trở thành một thách thức đối với việc kiểm soát kháng thuốc ở Việt Nam.

Klebsiella spp. mang gen mã hoá sinh ESBLs bao gồm gen SHV 39/51 (76,5%), TEM. 12/51 (23,5%) và CTX-M 11/51 (21,6%) chiếm đa số (Bảng 3.11).

Kết quả này không giống với xu hướng *Klebsiella* spp gây nhiễm trùng cộng đồng tại nước láng giềng Trung Quốc và Đài Loan và một số nước châu Âu của tác giả Jing, Lin và Cartia [70, 165, 300]. Tại các nghiên cứu này, gen chiếm đa số là CTX-M sau đó đến SHV và không có sự xuất hiện của TEM. Với *Klebsiella* spp. nhiễm trùng bệnh viện, xu hướng cũng tương tự, trong đó gen CTX-M chiếm đa số sau đó đến SHV, bao gồm cả dữ liệu của Việt Nam từ nghiên cứu giám sát của nhiều quốc gia trên thế giới [137]. Điều đáng quan tâm, có 1 tỷ lệ lớn các chủng *Klebsiella* spp. mang gen mã hoá carbapenemase, đây là một gen kháng thường chỉ xuất hiện ở trong bệnh viện do kháng sinh carbapenem là loại kháng sinh điều trị trong bệnh viện. Các nghiên cứu và các số liệu giám sát ở mức sinh học phân tử của về tính kháng của *Klebsiella* spp. của các nhiễm trùng khởi phát cộng đồng trên thế **giới đều không thấy sự xuất hiện của gen** này [57, 140, 261]. Việc xuất hiện gen kháng carbapenem tại cộng đồng với tỷ lệ không nhỏ này tăng mỗi đe dọa đang nổi lên đối với sức khỏe toàn cầu đó là làm tăng tỷ lệ mắc bệnh và tử vong cao của các người bệnh nhiễm *Klebsiella* spp. và tỷ lệ thất bại trong điều trị do *Klebsiella* spp. kháng thuốc. Trong đó *K.pneumoniae* là nguyên nhân gây ra khoảng một phần ba tổng số ca nhiễm vi khuẩn Gram âm trên toàn thế giới [195]. Hơn nữa, vấn đề này càng trầm trọng hơn do đại dịch COVID-19 do việc sử dụng kháng sinh tăng mạnh. Các nghiên cứu gần đây đã báo cáo tỷ lệ đồng nhiễm vi khuẩn do *K. pneumoniae* gây ra ở người bệnh COVID-19 (55,6%), đặc biệt là ở các đơn vị chăm sóc đặc biệt [75].

4.1.2.2 Thực trạng kháng với các loại kháng sinh của vi khuẩn *Klebsiella* spp.

Kết quả nghiên cứu cho thấy 100% vi khuẩn *Klebsiella* spp. kháng với amoxicilin (Biểu đồ 3.10), tỷ lệ này tương đồng với các nghiên cứu khác trong khu vực như ở Đài Loan, Trung Quốc, Ấn Độ, 100% các chủng vi khuẩn *Klebsiella* spp. phân lập được đều kháng với kháng sinh này [60, 70, 112, 165]. Trong khi nhóm amoxicillin + clavunin trong nghiên cứu này là 66,7% và khá cao so với các nghiên cứu khác, mặc dù tỷ lệ này khác nhau ở các quốc gia khác nhau, Bosnia and Herzegovina (44,5%) Mexico (43,5%), Uganda (36%), Ethiopia (32,1%). Tây Phi (30,3%), Iran (30%) Bồ Đào Nha (12%) và Đài Loan (10,5%) [60, 70, 94, 112, 165, 173, 192, 248].

Tỷ lệ kháng với kháng sinh cephalosporin thế hệ 3 là 37,3% (Biểu đồ 10) cao hơn so với nghiên cứu tại Mexico (35,8%), Bosnia and Herzegovina (20,3%)

Ethiopia (17,9%), Đài Loan (12,7%), Bồ Đào Nha (6%) [70, 94, 112, 165, 248]. Trong khi ở Thụy Sĩ tỷ lệ kháng với cephalosporin thế hệ 3,4 là 2,9% năm 2009 và 4,4% năm 2016 [297]. Tỷ lệ kháng còn cao hơn ở ceftazidime 49% và tỷ lệ này cao hơn so với nghiên cứu tại các quốc gia đang phát triển khác như Iran (42,7%), Bosnia and Herzegovina (29,33%) Mexico, Ethiopia, (17,9%) và Đài Loan 10,7% [94, 112, 173, 248].

25,5% *Klebsiella* spp. kháng với, nhóm kháng sinh quinolon, tương đương với nghiên cứu ở Ethiopia (25%) [248], cao hơn so với nghiên cứu tại Iran (16,1%), Uganda (10,7%) và Đài Loan là 15%, Thụy Sĩ là 11,4% năm 2016 [165, 173, 192, 297]. 39,2% *Klebsiella* spp. phân lập từ nghiên cứu này kháng với sulfamethoxazole + trimethoprim, cao hơn so với nghiên cứu tại Iran (32,9%) [173] Đài Loan (24,1%), Bosnia and Herzegovina (26,14%) [165], Thụy Sĩ là 10-11% [297], tuy nhiên thấp hơn nhiều so với nghiên cứu tại Uganda (69%) [192] và thấp hơn so với 1 nghiên cứu phân tích tổng hợp tại khu vực Tây Phi (58.4% (95% CI 22.6–89.8%)) [60, 248]

Đáng quá tâm là nhóm kháng sinh carbapenem, kết quả từ nghiên cứu này cho thấy 13,7% *Klebsiella* spp. kháng với meropenem, tuy nhiên tỷ lệ trung gian với kháng sinh này rất cao, lên tới 31,4% (Biểu đồ 10) cao hơn rất nhiều so với nghiên cứu tại Đài Loan (0,7%) [165] và Bồ Đào Nha (0%) [70], Bosnia and Herzegovina (1,3%) [94]. Trong khi đó nhóm Aminoglycoid có tỷ lệ kháng khác nhau giữa hai loại kháng sinh GEN (47,1%). Kết quả này cao hơn nhiều so với các nghiên cứu khác tại Mexico, tỷ lệ kháng với kháng sinh này chỉ là 17,9% [112]; tại Uganda (11%)[192] và Đài Loan 15,5% [165], Bồ Đào Nha 10% [70]. Tuy nhiên với kháng sinh khác của nhóm aminoglycosid là amikacin, thì nghiên cứu này vi khuẩn *Klebsiella* phân lập được còn nhạy với kháng sinh này, trong khi đó các nghiên cứu tại các quốc gia khác, amikacin cũng bắt đầu có dấu hiệu kháng, tỷ lệ 2,5% ở Mexico, Bosnia and Herzegovina [97] và 5,3% ở Đài Loan [165].

Qua đây cho thấy vi khuẩn *Klebsiella* spp. phân lập được từ các nhiễm khuẩn ở cộng đồng tại Việt Nam đa phần có **tỷ lệ kháng với các loại kháng sinh khá cao hơn so với nghiên cứu tại 1 số quốc gia trên thế giới**. Điều này cho thấy thực trạng kháng của vi khuẩn *Klebsiella* spp. ở ngoài bệnh viện với các loại kháng sinh ở nước ta. Kết quả nghiên cứu là một kênh tham khảo cho các bác sĩ

điều trị cho người bệnh ngoại trú trong bối cảnh quốc gia chưa có đủ điều kiện thực hiện làm kháng sinh đồ với toàn bộ các nhiễm trùng trước khi kê đơn kháng sinh.

Trong nghiên cứu này có sự so sánh giữa các miền, *Klebsiella* spp. kháng với hai loại kháng sinh có sự khác biệt theo miền, đó là kháng caftazidime cao nhất ở miền Bắc (68%), tiếp đó là miền Trung (36,8%) và thấp nhất ở miền Nam chỉ có 14,3%. Sulfamethoxazole + trimethoprim cũng tương tự, cao nhất ở miền Bắc (64%) và miền Trung 21,1%, miền Nam không có chủng nào kháng với kháng sinh này. Meropenem có tỷ lệ kháng cao nhất ở miền Bắc 16% và tương tự ở miền Trung (15,8%) và không với miền Nam là 28,6% và miền Trung là 26,3% (Biểu đồ 3.11). Chúng tôi không có dữ liệu nghiên cứu tại cộng đồng Việt Nam để so sánh, tuy nhiên đây là một gợi ý cho các nghiên cứu tiếp theo để tìm hiểu nguyên nhân của tỷ lệ kháng của miền Nam thấp hơn rất nhiều so với 2 miền Bắc và miền Trung, đặc biệt là so với miền Bắc.

Tỷ lệ các chủng vi khuẩn *Klebsiella* đa kháng là 47,1% (24/51 chủng) (Biểu đồ 3.12), đây là một tỷ lệ đa kháng cao tại cộng đồng. Một nghiên cứu tổng hợp gần đây của tác giả Nur và cộng sự về tỷ lệ *K.pneumoniae* nhiễm khuẩn bệnh viện trên toàn thế giới cho thấy tỷ lệ này trung bình là 32,8%. Trong đó có những nghiên cứu chỉ ra tỷ lệ cao nhất là 98,1% và thấp nhất là 3,1% [184]. Đặc biệt *Klebsiella* spp. đa kháng đang được coi là thách thức lớn trong nhiễm khuẩn bệnh viện, khó điều trị và tỷ lệ tử vong cao lên tới 40-50% [289]. Vậy với tỷ lệ đa kháng của *Klebsiella* spp. từ nhiễm khuẩn cộng đồng này là tương đối cao và đáng báo động tới các bác sỹ điều trị, các nhà xây dựng chính sách, các nhà nghiên cứu khoa học trong việc tìm hiểu sâu về nguy cơ và sự lây lan của *Klebsiella* spp. đa kháng và giảm thiểu sự lan truyền của chủng này.

4.1.3. Một số yếu tố liên quan đến tình trạng mang gen kháng kháng sinh ở cộng đồng

Kháng kháng sinh là một vấn đề toàn cầu nghiêm trọng ở các quốc gia bất kể mức thu nhập và gây ra gánh nặng lớn về mặt tài chính và lâm sàng. Vi khuẩn đa kháng phát triển ở bất kỳ quốc gia hoặc khu vực nào đã được chứng minh là lây lan nhanh chóng, và tình trạng kháng thuốc là được công nhận là một vấn đề được gọi là Một sức khỏe. Tỷ lệ kháng thuốc kháng sinh cao hơn ở một số quốc gia thu nhập thấp và quốc gia thu nhập trung bình. Chất lượng quản trị, chi tiêu

công cho y tế, nghèo đói, giáo dục và cơ sở hạ tầng công cộng được biết là có ảnh hưởng đến kết quả sức khỏe. Tuy nhiên, các nghiên cứu đều chưa được ngoại suy ra quy mô toàn cầu [88]. Do đó, tại mỗi quốc gia, các dữ liệu về các yếu tố ảnh hưởng đến sự lây lan của vi khuẩn kháng kháng sinh là kênh quan trọng nhằm kiểm soát được tình hình kháng thuốc tại quốc gia. Trong nghiên cứu của chúng tôi phân tích một số yếu tố được xem xét có liên quan đến tình trạng mang gen kháng kháng sinh. Các yếu tố liên quan phân tích trong nghiên cứu của chúng tôi bao gồm nguồn nước sinh hoạt, được tư vấn khi mua thuốc tại hiệu thuốc.

Những người sống ở gia đình có dùng nước giếng đào/giếng khoan cho ăn uống có nguy cơ mang gen kháng kháng sinh thấp hơn 0,4 lần so với những gia đình dùng nước máy hoặc nước mưa (Bảng 3.15). Kết quả này cũng được ghi nhận tương tự theo một báo cáo phân tích đa biến về các yếu tố nhân học và xã hội học liên quan đến kháng kháng sinh của toàn cầu. Các yếu tố điều kiện sống, cơ sở hạ tầng và vệ sinh môi trường được coi là yếu tố quan trọng có liên quan đến tình trạng kháng kháng sinh [88]. Trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng sử dụng nước giếng đào, giếng khoan có nguy cơ thấp cơ nhiễm vi khuẩn kháng kháng sinh thấp hơn so với sử dụng nước máy và nước mưa. Vi khuẩn không sống cô lập mà dễ dàng phát tán ra khắp thế giới bởi con người, động vật, thực vật, đất, nước và không khí. Những quan tâm gần đây cho thấy rằng nước uống chính là con đường chính truyền vi khuẩn gây bệnh cho người. Nước bao gồm cả nước đã xử lý vẫn có thể nhiễm vi khuẩn mang gen kháng thuốc và vi khuẩn này sẽ vào hệ tiêu hoá. Điều này có thể dẫn đến sự trao đổi gen với vi khuẩn (vi khuẩn chí hoặc gây bệnh) đã có trong ruột người động vật. Ngoài ra, nước được sử dụng để tưới cây cho động vật và con người, làm ô nhiễm các sản phẩm cũng có thể dẫn đến sự xâm nhập của người/động vật với các sinh vật kháng thuốc kháng kháng sinh [107]. Mặc dù TCYTTG và các quốc gia đã đưa ra các chính sách mạnh mẽ tập trung vào việc quản lý sử dụng kháng sinh ở bệnh viện, cộng đồng và trong chăn nuôi tuy nhiên kháng kháng sinh là vấn đề một sức khỏe, bao gồm cả yếu tố môi trường do đó việc tiếp tục đẩy mạnh cải thiện điều kiện sống và vệ sinh môi trường là biện pháp song hành.

Nguyên nhân của tình trạng kháng thuốc ở các nước đang phát triển rất phức tạp và có thể bắt nguồn từ thực hành của các nhân viên y và hành vi của người bệnh đối với việc sử dụng thuốc kháng sinh cũng như chuỗi cung ứng thuốc

kháng sinh trong cộng đồng. Một số yếu tố này bao gồm thực hành kê đơn không phù hợp, giáo dục người bệnh không đầy đủ, việc bán thuốc kháng sinh trái phép, thiếu cơ chế quản lý thuốc hoạt động thích hợp và việc sử dụng thuốc kháng sinh không do con người sử dụng như trong chăn nuôi. Trong nghiên cứu của chúng tôi cho kết quả việc người dân sử dụng kháng sinh có sự tư vấn của người bán thuốc có nguy cơ mang gen kháng kháng sinh cao hơn (Bảng 3.15) [52]. Nghiên cứu ở Ba Vì trên 823 trẻ năm 2007 cho thấy việc tìm kiếm dịch vụ y tế tại bất kỳ cơ sở y tế nào: hiệu thuốc, phòng khám công hay tư đều làm tăng khả năng sử dụng kháng sinh trong điều trị viêm đường hô hấp cấp nhẹ; và 82% trường hợp sử dụng kháng sinh không cần thiết là theo lời khuyên của người cung cấp dịch vụ y tế [126]. Vì vậy có thể thấy rằng kiến thức, thực hành của nhà cung cấp dịch vụ y tế tác động trực tiếp tới việc sử dụng kháng sinh của người dân trong cộng đồng. Vì vậy nếu nhà cung cấp có kiến thức, thực hành không tốt trong sử dụng kháng sinh sẽ dẫn tới thực hành sai trong cộng đồng và làm tăng nguy cơ kháng kháng sinh trong cộng đồng. Cùng với những phân tích về sử dụng kháng kháng sinh không theo đơn ở trên, kết quả nghiên cứu đưa thêm bằng chứng cho các nhà xây dựng chính sách để có những chính sách và biện pháp can thiệp phù hợp.

4.2. Thực trạng kiến thức và sử dụng kháng sinh của người bệnh và gia đình người bệnh đến khám tại trạm y tế xã

4.2.1. Kiến thức về kháng sinh và kháng kháng sinh của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã

Một bằng chứng toàn cầu quan trọng đã chỉ ra rằng cộng đồng nói chung đóng một vai trò trong việc gia tăng và lan rộng tình trạng kháng kháng sinh [96, 122, 295]. TCYTTG đã xác định ba vấn đề chính cần sự tham gia của cộng đồng: cải thiện khả năng tiếp cận các cơ sở y tế, giảm việc sử dụng kháng sinh không cần thiết, thực hiện đầy đủ liệu trình điều trị và không cho người khác dùng thuốc hoặc giữ lại thuốc còn thừa cho lần ốm sau. TCYTTG cũng kêu gọi các nước thành viên thực hiện các can thiệp giáo dục cho người bệnh và người dân nói chung nhằm hợp lý hóa việc sử dụng kháng sinh để chống lại tình trạng kháng thuốc [206]. Vì vậy, nâng cao kiến thức cộng đồng và thay đổi thái độ của họ đối với việc sử dụng kháng sinh sẽ là một chiến lược ban đầu rất quan trọng để duy trì hiệu quả của kháng sinh. Tuy nhiên, có nhiều sự khác biệt trong việc sử dụng kháng sinh trên toàn cầu và việc điều chỉnh các can thiệp giáo dục đòi hỏi sự hiểu

biết về kiến thức, thái độ và hành vi của công chúng đối với việc sử dụng kháng sinh ở mỗi quốc gia. Mặc dù một số nghiên cứu đã xác định việc sử dụng kháng sinh, kiến thức, thái độ và hành vi của dân số chung trên toàn thế giới [45, 101, 152, 180, 181], nhưng theo hiểu biết của chúng tôi chưa có nghiên cứu trên diện rộng về số liệu tại Việt Nam.

Kết quả của nghiên cứu này về kiến thức của người bệnh đến khám tại trạm y tế cho thấy phần lớn các đối tượng trả lời sai về dấu hiệu bệnh cần sử dụng kháng sinh (57% sai) và nhận thức về tác động của việc sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi tới kháng kháng sinh (72,6%). Chỉ có 57% người được dân được hỏi trả lời kháng sinh để điều trị vi khuẩn hoặc không biết điều trị cho vi khuẩn hay vi rút. Hắt hơi/sổ mũi/đau đầu/cúm là nguyên nhân phổ biến mà người dân cho rằng có thể dùng kháng sinh để điều trị (46,5%), sốt (42%) và đau cơ/xương/khớp (15%) (Bảng 3.17). Các nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng cúm là nguyên nhân phổ biến để dùng kháng sinh. Tuy nhiên ở nghiên cứu này, tỷ lệ cao hơn nhiều so với nghiên cứu ở Thái Lan, cúm là 27%, đau họng 16,8% và sốt là 19,2%, cao hơn khi so sánh với các nghiên cứu khác được thực hiện ở Yogyakarta (29,0%), Kuwait (29,8%), Hàn Quốc (30,6%) [50, 144, 287]. Hơn nữa, nhiều người vẫn nghĩ rằng thuốc kháng sinh có thể đẩy nhanh quá trình chữa ho hoặc sổ mũi và nên dùng thuốc kháng sinh cho tất cả các bệnh. Những dữ liệu đó cho thấy người trả lời thiếu kiến thức về vai trò của thuốc kháng sinh trong điều trị các bệnh truyền nhiễm nói chung. Hơn nữa, các cán bộ y tế cũng có vai trò trong việc ngăn ngừa và kiểm soát sự lây lan của tình trạng kháng thuốc kháng sinh, chẳng hạn như bằng cách đảm bảo việc sử dụng thuốc kháng sinh một cách thận trọng cũng như giáo dục người bệnh về tình trạng kháng thuốc kháng sinh, sự nguy hiểm của việc lạm dụng thuốc và tầm quan trọng của việc ngăn ngừa nhiễm trùng [209].

Xét về kiến thức theo các vùng miền, kiến thức ở miền Bắc lại thấp nhất trong số ba miền (30,2%), và miền Nam cao nhất (49%). Tuy nhiên, thực hành của miền Bắc lại tốt hơn so với miền Nam (31,8% so với 6,6%) và so với miền Trung (31,8% so với 11,8%) (Bảng 3.17). Kết quả này cho chúng ta thấy, việc thực hành sử dụng kháng sinh có thể phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác, bao gồm sự sẵn có, thuận tiện của các dịch vụ y tế, chi phí các dịch vụ y tế...[126], đặc biệt ở các nước đang phát triển và nơi mức độ bao phủ của bảo hiểm y tế thấp. Đây là vấn đề cần nghiên cứu kỹ để đưa ra các chương trình can thiệp hiệu quả. Nghiên

cứu cho thấy một số yếu tố liên quan tới kiến thức, thực hành về sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh. Các yếu tố về trình độ văn hoá, nghề nghiệp và thu nhập tốt có kiến thức và thực hành tốt hơn về sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh. Mỗi liên quan này tương đồng với kết quả nghiên cứu của vùng Tây Nguyên Việt Nam, Thái Lan và một số nghiên cứu khác ở cả các nước phát triển[179, 267].

Tuy nhiên ở một khía cạnh khác, kiến thức tốt hơn về kháng sinh được kỳ vọng sẽ cải thiện thực hành đối với việc sử dụng kháng sinh vì nó giúp mọi người hiểu rõ hơn về vai trò của kháng sinh và những tác động tiêu cực của việc sử dụng sai mục đích. Để thay đổi hành vi, mọi người cần biết hậu quả của hành vi của mình. Thiếu kiến thức của cộng đồng về thuốc kháng sinh có thể khiến số lượng người tự dùng thuốc cao [152]. Kết quả của việc sử dụng kháng sinh và hiểu biết về kháng sinh trong nghiên cứu này của các miền cho thấy miền Bắc có kiến thức thấp hơn và sử dụng kháng sinh nhiều hơn. Mặc dù khi đưa vào mô hình phân tích hồi quy không có ý nghĩa, có thể do cỡ mẫu còn chưa đủ. Vì vậy, để ngăn ngừa việc tự dùng thuốc kháng sinh và thay đổi thói quen không lành mạnh này, cần xây dựng các chương trình giáo dục đa diện nhằm nâng cao kiến thức cộng đồng về thuốc kháng sinh và nâng cao nhận thức của cộng đồng về tình trạng kháng thuốc kháng sinh.

Antibiotics: Handle with Care” là chiến dịch do TCYTTG phát động nhân Tuần lễ Nhận thức về kháng sinh Thế giới đầu tiên vào năm 2015. Chủ đề của chiến dịch phản ánh thông điệp hướng tới cộng đồng rằng kháng sinh là một nguồn tài nguyên quý giá và cần được bảo tồn. Chúng nên được sử dụng để điều trị các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn, chỉ khi được chỉ định bởi bác sĩ được hành nghề. Thuốc kháng sinh không bao giờ được chia sẻ hoặc để dành cho tương lai. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, 69,1% số người được hỏi cho rằng “có thể sử dụng kháng sinh mà không cần đơn của bác sĩ”, 56,9% số người được hỏi cho rằng “KS nên được dự trữ tại nhà”. Đây là một yếu tố cần chú ý trong các xây dựng truyền thông cho người dân và cả các cán bộ y tế.

4.2.2. Thực trạng sử dụng kháng sinh ở cộng đồng.

Theo nghiên cứu của chúng tôi tình hình sử dụng kháng sinh ở ngoài cộng đồng là khá phổ biến. Tỷ lệ sử dụng kháng sinh trong 3 tháng là 37,5% và trong gia đình của người bệnh là 54,6%. Số lần sử dụng kháng sinh trung bình 1

lần/tháng (Bảng 3.18). Kết quả này tương tự so với điều tra của TCYTTG ở các nước khu vực và ở Việt Nam năm 2015 [208], cao hơn so với điều tra trong quần thể dân số nói chung ở Malaysia (16,5% trong vòng 4 tuần) [163] và Serbia và Barbados (19%). Tỷ lệ này thấp hơn so với báo cáo ở Ai Cập, tỷ lệ sử dụng kháng sinh trong 01 tháng qua là 54% [139]. Nghiên cứu ở Kuwait cho thấy hơn hai phần năm ($n = 226$; 45,7%; CI: 41,2–50,2) trong số họ báo cáo việc sử dụng kháng sinh theo chỉ định từ hai đến năm lần trong năm qua, 31,7% một lần, 4,6% sáu đến mười lần và 3,6% nhiều hơn 10 lần [50]. Đặc điểm sử dụng kháng sinh này khác biệt rõ ràng giữa các miền và có ý nghĩa thống kê. Miền Bắc có tỷ lệ sử dụng kháng sinh cao nhất (92,8%), trong khi miền Trung và miền Nam là 72,4% và 72,9% (Bảng 3.18). Đây là đặc điểm theo miền đáng chú ý để tìm hiểu thêm các yếu tố liên quan đến việc sử dụng kháng sinh nhiều ở khu vực miền Bắc để từ đó xây dựng các chương trình can thiệp nhằm làm giảm tỷ lệ sử dụng kháng sinh ở cộng đồng. Nói chung lại, kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ sử dụng kháng sinh ở Việt Nam là cao. Mặc dù năm 2015 kết quả điều tra của TCYTTG đã cho thấy tỷ lệ cao này, tuy nhiên các chương trình can thiệp, các chính sách làm giảm tỷ lệ sử dụng kháng sinh chưa cho thấy hiệu quả. Việc sử dụng kháng sinh ở người tại cộng đồng góp phần không nhỏ vào số lượng kháng sinh sử dụng của quốc gia. Việt Nam được ghi nhận là quốc gia sử dụng kháng sinh cao nhất khu vực Đông Nam Á (30 DDD/1000/ngày) và cũng là quốc gia trong nhóm có tỷ lệ sử dụng tăng nhanh nhất, từ 59% năm 2000 đến 74% năm 2018 [65]. Trong khi đó mối quan hệ giữa việc sử dụng kháng sinh và sự phát triển và lan truyền của kháng kháng sinh đã có nhiều tài liệu ghi nhận [40, 114, 269].

Kết quả của nghiên cứu cho thấy ở gia đình việc sử dụng kháng sinh ở trẻ em là phổ biến 44,8% (642/1432) (Bảng 3.19). Kết quả này tương đương với kết quả nghiên cứu ở các nước đang phát triển khác [76, 120]. Tác giả Lasson và cộng sự tại Ba Vì, Hà Nội cho thấy kết quả tương tự về tỷ lệ sử dụng kháng sinh ở trẻ em rất cao trong vòng 1 tháng trước thời điểm nghiên cứu [154]. Tỷ lệ sử dụng kháng sinh ở trẻ em cao cũng được giải thích với lý do là các bệnh truyền nhiễm ở trẻ em dưới 5 tuổi cao hơn so với người lớn, đặc biệt ở các quốc gia có thu nhập thấp. Một ước lượng toàn cầu về lượng kháng sinh sử dụng ở các quốc gia có thu nhập thấp cao gấp đôi so với các quốc gia có thu nhập cao [146]. Điều này có thể phần nào chứng minh lý do sử dụng nhiều kháng sinh ở trẻ em hơn.

Kháng sinh sử dụng chăn nuôi chiếm số lượng lớn trong lượng kháng sinh được sử dụng ở các quốc gia. Kết quả của nghiên cứu cho thấy 34,2% hộ gia đình được hỏi có sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi (Biểu đồ 3.15). Do nhu cầu ngày càng tăng trên toàn cầu đối với protein động vật, do đó gia tăng việc sử dụng trong chăn nuôi, là mối quan tâm đáng kể đe dọa của tình trạng kháng thuốc. Sử dụng thuốc kháng sinh ở động vật có liên quan đến nhiễm trùng kháng thuốc ở động vật và người. Kháng sinh sử dụng trong động vật được ước lượng là cao hơn rất nhiều lần so với kháng sinh sử dụng cho người và sự khác biệt là hầu hết kháng sinh sử dụng cho động vật để tăng trưởng và phòng bệnh hàng loạt. Những cách này thường sử dụng thông qua thức ăn trong chăn nuôi, tác động trực tiếp vào hệ tiêu hoá và có liều thấp do đó nó thúc đẩy sự tiến hoá của đề kháng. Những yếu tố này cho thấy động vật là ổ chứa các gen kháng kháng sinh nhiều hơn từ người [268]. Do đó vào tháng 9 năm 2016, Đại hội đồng Liên hợp quốc đã công nhận việc sử dụng thuốc kháng sinh không phù hợp ở động vật là nguyên nhân hàng đầu làm tăng kháng thuốc và đưa ra các hành động nhằm làm giảm tình trạng sử dụng kháng sinh ở động vật bao gồm việc cấm sử dụng kháng sinh trong thức ăn cho động vật. Việc dừng sử dụng kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi đã thực hiện đầu tiên ở Đan Mạch và các nước châu Âu. Việt Nam cũng đã thực hiện việc dừng sử dụng kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi từ năm 2018 trong Luật Chăn nuôi [8]. Tuy nhiên số liệu nghiên cứu cho thấy trên thực tế việc sử dụng kháng sinh trong thức ăn cho việc phòng bệnh và tăng trưởng vẫn tồn tại với tỷ lệ cao. Do đó các chương trình truyền thông cho người chăn nuôi, người bán thuốc thú y là hết sức cần thiết cũng như việc kiểm tra, giám sát việc thực thi các quy định của nhà nước.

Kháng sinh điều trị nhiều triệu chứng khác nhau trong gia đình. Phổ biến nhất trong gia đình vẫn dùng để điều trị cho các bệnh nhiễm trùng. 69,3% (993/1432) số người được hỏi trả lời gia đình sử dụng để điều trị cho điều trị các bệnh nhiễm trùng, tuy nhiên tỷ lệ này ở miền Bắc là 59,8% cao hơn hẳn so với miền Trung (16,4%) và miền Nam (23,8%). Tuy nhiên có một tỷ lệ cao 39,5% (565/1432) số người được hỏi trả lời gia đình sử dụng kháng sinh để điều trị các triệu chứng hắt hơi, sổ mũi, đau người (Bảng 3.19). Tỷ lệ sử dụng kháng sinh không hợp lý này cao hơn so với báo cáo của TCYTTG [286]. Đa phần người sử dụng kháng sinh trong khoảng thời gian từ 5-7 ngày (chiếm 76,4%). Nhiều nghiên

cứu trước đây đã ghi nhận các yếu tố liên quan đến việc sử dụng kháng sinh không phù hợp bao gồm văn hóa, tình trạng giáo dục, tuổi, bảo hiểm y tế và mức độ hài lòng với dịch vụ chăm sóc sức khỏe, và bảo quản thuốc kháng sinh tại nhà [256]. Do đó, các biện pháp can thiệp tập trung vào cộng đồng như cải thiện khả năng tiếp cận các dịch vụ y tế, giảm sử dụng kháng sinh không cần thiết, điều trị đầy đủ và không dùng chung thuốc với người khác cần được triển khai.

Việc tự dùng thuốc kháng sinh không theo đơn của bác sĩ là hiện tượng khá phổ biến đặc biệt ở các quốc gia đang phát triển. Việc tự dùng kháng sinh có liên quan đến nguy cơ sử dụng thuốc không phù hợp, khiến người bệnh dễ bị tương tác thuốc, che giấu các triệu chứng của bệnh tiềm ẩn và phát triển sự kháng thuốc của vi khuẩn. Thực hành sử dụng thuốc không phù hợp thường gặp trong việc tự mua thuốc bao gồm thời gian điều trị ngắn, không đủ liều, dùng chung thuốc và tránh điều trị khi cải thiện các triệu chứng bệnh. Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy tỷ lệ sử dụng thuốc không theo đơn (self-medication) là 30% ở đối tượng nghiên cứu và 35,8% ở gia đình của họ trong 3 tháng trước thời điểm nghiên cứu. Tỷ lệ dùng lại đơn của người khác là 9,6%. Tỷ lệ sử dụng kháng sinh không theo đơn này khác nhau giữa các vùng miền của Việt Nam (Biểu đồ 3.14). Một nghiên cứu tổng hợp năm 2015 của tác giả Moses Ocan và cộng sự phân tích trên 34 nghiên cứu cắt ngang với thời gian nhớ lại từ 2 tuần đến 1 năm về sử dụng kháng sinh không theo đơn của bác sĩ cho thấy tỷ lệ người tự sử dụng kháng sinh không theo đơn ở các nước có thu nhập thấp và trung bình là 38,8%[204]. Vậy tỷ lệ sử dụng không theo đơn ở trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn không đáng kể so với tỷ lệ của nghiên cứu tổng hợp này. Một nghiên cứu tổng hợp được TCYTTG thực hiện ở các quốc gia Châu Á với 19 nghiên cứu cắt ngang ở các quốc gia, cỡ mẫu của các nghiên cứu dao động từ 110 đến 29.960 mẫu, với thời gian nhớ lại từ 1 tháng đến 1 năm. Kết quả cho thấy tỷ lệ sử dụng kháng sinh không theo đơn của bác sĩ dao động từ 7,3%-85,59% và tỷ lệ trung bình là 42,64%. Vậy với các nghiên cứu có thiết kế tương tự thì tỷ lệ này cao hơn so với nghiên cứu của chúng tôi [197].

Tuy nhiên so sánh với các số liệu nghiên cứu của chúng tôi xét về tính tương đồng của đối tượng nghiên cứu là người dân ở cộng đồng thì tỷ lệ của nghiên cứu này là cao so với các nghiên cứu tương tự của các quốc gia trong nghiên cứu như Indonesia, Butan, Bangladesh. Nghiên cứu của Mohitosh Biswas

và cộng sự trên 1300 đối tượng người dân ở một thành phố phía Bắc Bangladesh, tỷ lệ sử dụng kháng sinh không theo đơn của bác sĩ tại đây là 26,69% [61]. Một nghiên cứu cắt ngang ở Butan năm 2014 trên 692 người đến khám tại 5 bệnh viện cho kết quả tỷ lệ người sử dụng kháng sinh không có đơn của bác sĩ chỉ là 23,6% [263]. Một nghiên cứu cắt ngang khác của Aris Widayati và cộng sự ở 625 hộ gia đình của 1 thành phố ở Indonesia cho thấy tỷ lệ tự sử dụng kháng sinh mà không có đơn của bác sĩ trong 4 tuần chỉ có 7,3% [287].

Một số nghiên cứu khác của các quốc gia trong khu vực Châu Á cho thấy tỷ lệ sử dụng kháng sinh không theo đơn của bác sĩ cao hơn nghiên cứu của chúng tôi. Nghiên cứu cắt ngang của tác giả Kurniawan và cộng sự tại 1 huyện khác của Indonesia năm 2015 trên 400 người trên 18 tuổi cho thấy tỷ lệ sử dụng kháng sinh không theo đơn của bác sĩ trong 6 tháng trước thời điểm nghiên cứu lên tới 45% [152]. Một nghiên cứu cắt ngang khác tại Ấn Độ năm 2014 trên 792 đối tượng cho thấy tỷ lệ sử dụng kháng sinh không theo đơn của bác sĩ là 39,1% [109]. Trong khi đó 1 nghiên cứu cắt ngang tại Hàn Quốc năm 2007 của tác giả Kim và cộng sự trên 1197 đối tượng trên 18 tuổi cho tỷ lệ 46,9% [144].

Kết quả trong nghiên cứu này cũng tương đồng với một số nghiên cứu khác tương tự ở một số quốc gia đang phát triển như Thái Lan, Jordan. Nghiên cứu tại Thái Lan của tác giả Kanjanachaya Sirijot trên 396 người trên 18 tuổi cho thấy tỷ lệ mua kháng sinh không có đơn của bác sĩ là 37,37% [249] và nghiên cứu ở 1 thành phố ở Ấn Độ của tác giả Akram Ahmad trên cỡ mẫu 600 người cho tỷ lệ 33,5% số người thường xuyên mua kháng sinh không theo đơn của bác sĩ [33]. Tuy nhiên tỷ lệ sử dụng kháng sinh không theo đơn của bác sĩ rất thấp ở các quốc gia phát triển chỉ từ 1%-4% [116].

Tại Việt Nam, nghiên cứu về tự sử dụng thuốc kháng sinh không theo đơn của bác sĩ không có nhiều. Các nghiên cứu phân tích tổng hợp về sử dụng kháng sinh không theo đơn và tự kê đơn đều không có số liệu từ các nghiên cứu của Việt Nam [204, 260] trừ một nghiên cứu của tác giả Junko Okumura năm 2002 cho thấy tỷ lệ này chỉ là 12,7% trên nhóm phụ nữ nông thôn của 4 tỉnh Nghệ An, Thanh Hoá, Cần Thơ và Đồng Tháp [205].

Tự dùng thuốc kháng sinh có thể dẫn đến các tác dụng không mong muốn, chẳng hạn như giảm hiệu quả và tồi tệ hơn tình trạng lâm sàng và đã trở thành một yếu tố quan trọng thúc đẩy sự kháng thuốc của vi khuẩn [229]. Hậu quả như

vậy có thể gây nguy hiểm đến sức khỏe của cá nhân người tự chữa bệnh cũng như toàn xã hội. Các vấn đề liên quan đến việc tự mua thuốc kháng sinh, đặc biệt là ở các nước đang phát triển, rất phức tạp vì chúng có liên quan đến các vấn đề khác, chẳng hạn như nghèo đói, thiếu khả năng tiếp cận thuốc và thông tin liên quan đến thuốc, chất lượng cơ sở y tế kém và việc thực hiện yếu kém quy định liên quan đến thuốc. Ví dụ, giới hạn về quyền được mua có liên quan đến việc tự mua thuốc kháng sinh trong cộng đồng dân cư ở Kerala Ấn Độ [239], người lớn gốc Latinh ở Hoa Kỳ [172]. Ngoài ra, vì tiết kiệm, người nghèo có thể mua không đủ lượng thuốc kháng sinh không được kê đơn. Họ có thể bị buộc phải mua thuốc kháng sinh không cần đơn với giá thấp ở các ki-ốt thông thường (tức là với những người bán không chuyên), có thể là thuốc kém chất lượng hoặc hàng giả. Các vấn đề khác liên quan đến chất lượng kém và khả năng tiếp cận dịch vụ y tế không đầy đủ cũng tồn tại, chẳng hạn như thời gian chờ đợi, nguồn cung cấp thuốc hạn chế, trình độ chuyên môn không được chấp nhận của các chuyên gia y tế tại các cơ sở y tế, chi phí vận chuyển cao để đến các trung tâm y tế, và không có bảo hiểm y tế [118, 239]. Những vấn đề như vậy thực sự thuyết phục mọi người tự dùng thuốc thay vì tìm kiếm sự tư vấn y tế. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chưa đề cập đến các nguyên nhân của việc sử dụng thuốc không theo đơn. Tuy nhiên theo số liệu từ nghiên cứu này, với một tỷ lệ lớn người dân sử dụng không theo đơn, cần thiết phải có các nghiên cứu tìm hiểu các mô hình sử dụng thuốc kháng sinh và các yếu tố liên quan đến việc sử dụng đó là điều cần thiết để cải thiện việc sử dụng thuốc kháng sinh phù hợp. Những thông tin dịch tễ học như vậy rất hữu ích trong việc hướng dẫn xây dựng các can thiệp giáo dục [115], đặc biệt là để hiểu rõ các hiệu quả của việc sử dụng kháng sinh, xác định các nguyên nhân có thể xảy ra và xác định mục tiêu của các can thiệp trong tương lai [201].

4.3. Mối liên quan về kiểu gen của các chủng vi khuẩn phân lập được với các chủng đã từng phát hiện ra ở Việt Nam và trên thế giới

4.3.1. Mối liên quan về kiểu gen giữa các chủng vi khuẩn *E.coli* phân lập được trong nghiên cứu và với các vi khuẩn *E.coli* phân lập được tại Việt Nam và trên thế giới

Escherichia coli là một trong những vi khuẩn kháng thuốc đang rất được quan tâm trên toàn thế giới. Loài vi khuẩn này không chỉ là nguyên nhân hàng đầu của các bệnh nhiễm trùng qua thực phẩm mà còn đại diện cho một nguồn dự

trữ chính của các gen kháng thuốc (ARGs) do khả năng tích lũy ARGs cao, chủ yếu là thông qua chuyển gen ngang. Ngoài ra, *E. coli* đã được phát hiện có vai trò quan trọng trong việc phổ biến các gen kháng thuốc như *bla*NDM-1, *mcr*, và/hoặc *tet* (X3) (X4); những ARGs này làm trung gian cho việc kháng những kháng sinh cuối cùng (carbapenems, colistin và tigecycline) ở vi khuẩn gram âm, điều này có thể dẫn đến việc không có sẵn thuốc kháng vi sinh vật ở cả người và thuốc thú y. Ngoài ra, *E. coli* sản sinh ESBLs cũng là một vấn đề sức khỏe toàn cầu lớn. Do đó, *E. coli* thường được sử dụng như một dấu ấn sinh học để giám sát các kháng thuốc ở các trang trại chăn nuôi và hoặc trong bệnh viện [217].

Trong đó các nghiên cứu mức độ sinh học phân tử là một trong những kỹ thuật quan trọng trong theo dõi sự lan truyền của các vi khuẩn kháng thuốc. MLST trình bày dữ liệu về mối quan hệ di truyền giữa các ST của các chủng *E.coli*. Trong nghiên cứu của chúng tôi kết quả phân tích cây phát sinh loài đã chỉ ra mối liên hệ gần gũi về mặt kiểu gen giữa các chủng vi khuẩn nghiên cứu được phân lập từ các loại mẫu bệnh phẩm khác nhau và các địa bàn nghiên cứu khác nhau. Các chủng này có cả ở trên cùng một địa phương như Hải Dương (chủng AHDPH03 và AHDMU12), mặc dù trên các loại mẫu bệnh phẩm khác nhau. Một số chủng thuộc cùng một ST và có sự gần gũi về mặt di truyền nhưng đến từ các địa phương khác nhau như Khánh Hoà và Hà Nội (AKHPH15 và AHNOIPH16) hay Hà Nội và Hà Nam (AHNOTH22 và AHNAPH48) cho thấy sự xuất hiện của các chủng *E.coli* có mang gen kháng thuốc ở một số tỉnh thành của Việt Nam.

Phân tích tiếp theo về ST trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy ST10 chiếm đa số (23%) và có mặt ở các cộng đồng nghiên cứu khác nhau và các chủng ở các địa điểm khác nhau cũng khá tương đồng về các kiểu gen kháng thuốc. ST10 có mặt ở 3 địa phương (Hà Nội, Khánh Hoà, Bến Tre) của cả miền trong địa điểm nghiên cứu chứng tỏ chủng *E.coli* thuộc ST10 đã lưu hành và lây lan giữa các cộng đồng Việt Nam. Hơn nữa các chủng *E.coli* thuộc ST này mang nhiều loại gen kháng kháng sinh của các nhóm khác nhau và hầu hết mang gen CTX-M bao gồm 3 biến thể CTX-M-15, CTX-M-27, CTX-M-55 và nhiều các gen kháng kháng sinh nhóm khác tetracycline (*tetA*), macrolide (*mphA*), trimethoprim+sulfonamides (*sul1*, *sul2*, *sul3*, *dfrA17*), phenicols (*floR*) và 71% là các chủng đa kháng. ST10 thuộc CC10 và là một ST đang lưu hành trên thế giới. Quan trọng hơn là ST10 lưu hành nhiều ở cộng đồng và được tìm thấy nhiều

ở lợn, gà và người chăn nuôi ở trang trại do đó chủng *E.coli* thuộc ST10 đang được thế giới xem xét là chủng có khả năng lây lan cao từ động vật như lợn, gà sang người [36, 51, 217]. Một số nghiên cứu tại Việt Nam gần đây tiếp tục củng cố thêm giả thuyết về việc ST10 có khả năng lây lan cao từ động vật sang người. Kết quả của tác giả Bích và cộng sự nghiên cứu trên nhóm cộng đồng bao gồm cả mẫu người và động vật, cho thấy xuất hiện chủng *E.coli* thuộc ST10 từ các mẫu của cả người và vật nuôi tại một cộng đồng nghiên cứu [277]. Tác giả Ngọc, Truong và cộng sự [198, 261] thực hiện nghiên cứu trên nhóm người bệnh nhiễm trùng cộng đồng và các vật nuôi, thực phẩm cho thấy có sự xuất hiện chủng *E.coli* thuộc ST10 trên mẫu của người bệnh nhiễm trùng nước tiểu tại cộng đồng và mẫu từ gà, lợn tại cộng đồng đó và đều mang các biến thể gen kháng CTX-M tương đồng như nghiên cứu của chúng tôi. Nghiên cứu của tác giả Ngọc, Truong và cộng sự được thực hiện ở 1 địa phương nhất định và nghiên cứu của chúng tôi bổ sung thêm các địa phương lưu hành chủng ST10 ở các miền khác nhau. Đây cũng là một bằng chứng cho các nhà hoạch định chính sách có cơ sở để thiết lập giám sát các chủng *E.coli* kháng thuốc bằng tiếp cận MSK theo hướng dẫn của TCYTTG cho cả ngành 3 lĩnh vực y tế, nông nghiệp và môi trường và là một trong những chỉ số quan trọng khi xây dựng Chiến lược quốc gia về phòng chống kháng thuốc giai đoạn 2020-2030 [211]. Do sự phức tạp và phổ biến của *E.coli* kháng thuốc nên tổ TCYTTG đã đề cập “Hướng dẫn 3 vòng do TCYTTG lồng ghép giám sát toàn cầu về *E.coli* sinh ESBLs” (Tricycle protocol). Từ giám sát này sẽ kỳ vọng rằng dữ liệu tổng hợp và kết hợp được thu thập theo từng lĩnh vực sẽ được phân tích để mô tả các mô hình hiện tại và sự phát triển của sự xuất hiện và phổ biến toàn cầu của *E.coli* sinh ESBL. Thông tin thu được từ đặc điểm phân tử của các chủng phân lập sẽ giúp hiểu rõ hơn về sự xuất hiện và các con đường lan truyền KKS. Phương pháp này cũng sẽ cho phép phát hiện các xu hướng về sự phổ biến của *E.coli* sinh ESBLs trong từng lĩnh vực trong ba lĩnh vực và theo thời gian, cho phép đánh giá hiệu quả của các biện pháp can thiệp được thực hiện để kiểm soát kháng kháng sinh. “Tricycle protocol” cung cấp cho các quốc gia một hệ thống giám sát dọc để đánh giá tác động của các biện pháp can thiệp được áp dụng như một phần của kế hoạch hành động quốc gia.

Ba dòng ST phổ biến tiếp theo trong nghiên cứu của chúng tôi đó là ST131, ST38 và ST226, lần lượt chiếm 10%. Đây là 3 dòng ST cũng đã phổ biến ở Việt

Nam và trên thế giới. Các chủng trong nghiên cứu của chúng tôi đều mang nhiều gen KKS và là các chủng đa kháng. *E. coli* ST131, một chủng đại dịch trên toàn thế giới, chủ yếu gây nhiễm trùng đa kháng và có liên quan đến CTX-M-15. Nghiên cứu của chúng tôi cũng có kết quả tương tự như các nghiên cứu trên thế giới. Trong đó có 2 chủng tại 2 địa phương khác nhau khá tương đồng về kiểu gen đó là từ Hà Nội và Hà Nam. Hai chủng đều mang gen 2 gen sinh ESBLs bao gồm CTXM-15 và OXA-1, và nhiều gen kháng kháng sinh nhóm khác như nhóm, tetracycline (tetA), macrolide (mphA), trimethoprim+sulfonamides (sul1, dfrA17) và đều kháng với nhiều loại kháng sinh thử nghiệm (>4 nhóm). Các plasmid của hai chủng này cũng giống nhau. Chứng tỏ hai chủng này có khả năng cao là có chung một nguồn lây. Hà Nội và Hà Nam là hai địa phương gần nhau, do đó khả năng có chung nguồn lây là hoàn toàn có thể xảy ra, bao gồm cả nguy cơ lây chung từ các cơ sở y tế hoặc từ cộng đồng hoặc nguồn thực phẩm... Do đó các nghiên cứu tiếp theo để tìm hiểu rõ hơn các nguồn lây, đường lây của các chủng kháng này là cần thiết để giảm nguy cơ và tỷ lệ lây nhiễm. Tuy nhiên những nghiên cứu ở Việt Nam gần đây cho thấy ST131 không còn là ST phổ biến của *E. coli* tại cộng đồng và ít có nguy cơ lây từ động vật hơn so với ST10 [[194](#), [267](#), [284](#)].

Trong các chủng ST226 có 2 chủng khá tương đồng nhau về kiểu gen, plasmid và đều từ một địa phương là Hải Dương. Hai chủng đều mang gen 2 gen sinh ESBLs bao gồm OXA-1 và nhiều gen kháng kháng sinh nhóm khác như nhóm, tetracycline (tetB), macrolide (mphA), trimethoprim+sulfonamides (sul1, dfrA17), phenicols (catA), aminoglycoside (adA1, aadA5) và đều kháng với nhiều loại KS thử nghiệm (>4 nhóm), và đều nằm trên plasmid IncB/O/K/Z, kích thước của plasmid hoàn toàn giống nhau. Hai chủng này chỉ khác nhau gen CTX-M biến thể, một chủng mang CTX-M-14, một chủng mang CTX-M-27. Điều này có thể thấy rằng hai chủng này có khả năng rất cao từ một nguồn lây.

Những tiến bộ công nghệ mới về gen, phân tích dữ liệu, tin sinh học và các nguồn dữ liệu mới đã tạo cơ sở cho các phương pháp hay nhất để tiến hành giám sát trong phạm vi Một sức khỏe. Tuy nhiên, với việc sử dụng ngày càng nhiều các kỹ thuật WGS, cần có sự hợp tác sâu và tích hợp hơn với các tổ chức trong quốc gia cũng như các quốc gia khác để đảm bảo việc so sánh dễ dàng hơn và có ý nghĩa hơn.

4.3.2. Mối liên quan về kiểu gen giữa các chủng vi khuẩn

***K.pneumoniae* phân lập được trong nghiên cứu và với các vi khuẩn *K.pneumoniae* phân lập được tại Việt Nam**

Klebsiella spp. là một trong những vi khuẩn Gram âm có ý nghĩa lâm sàng quan trọng trên toàn cầu. Theo dõi các sinh vật kháng kháng sinh là một trong bốn hành động cốt lõi được đề xuất trong kế hoạch hành động kháng kháng sinh của CDC Hoa Kỳ nhằm hạn chế sự xuất hiện và lây lan của vi khuẩn kháng kháng sinh. Do đó chúng tôi thực hiện giải trình tự toàn bộ hệ gen của một số chủng được lựa chọn để có bức tranh rõ ràng hơn về cấu trúc sinh học phân tử của vi khuẩn phân lập được từ các nhiễm trùng cộng đồng, có hay không mối liên quan giữa các kiểu gen của các chủng phân lập được tại các địa bàn khác nhau và với các chủng đã được phân lập từ các nghiên cứu trước tại Việt Nam và trên thế giới để từ đó có những bằng chứng nhằm đưa ra biện pháp, chính sách can thiệp phù hợp và mang tính tổng thể hơn trong nỗ lực làm chậm sự phát triển của các vi khuẩn kháng với các loại kháng sinh đang có hiện nay ở Việt Nam và trên thế giới.

Trong 9 chủng lựa chọn phân tích, 8 chủng là *K.pneumoniae* và 1 chủng là *K.aerogenes*. Chủng *K.aerogenes* không mang bất cứ gen kháng thuốc nào và còn nhạy với các loại kháng sinh cephalosporin thế hệ 3 và các kháng sinh dòng khác. Điều này củng cố thêm rằng *K.pneumoniae* đáng quan ngại nhất cả về độc lực gây bệnh và mức độ kháng thuốc trong các loài *Klebsiella* spp. [64, 127].

Phân tích phylogenetic cho thấy ở *K.pneumoniae* xuất hiện đa dạng các ST15 (2 chủng đều ở Thừa Thiên Huế), ST16 (1 chủng ở Cần Thơ), ST273 (1 chủng), ST1886 (1 chủng), và 3 loài mới chưa xác định. Chúng tôi không tìm thấy các nghiên cứu phân tích sinh học phân tử đến loài ở các nhiễm khuẩn cộng đồng ở Việt Nam. So sánh với các chủng *K.pneumoniae* được phân tích từ các nghiên cứu ở các bệnh viện ở Việt Nam cho thấy, có 3 ST đã được mô tả ở các nghiên cứu tại các bệnh viện là ST15, ST16 và ST273. ST15, ST16 được tìm thấy nhiều hơn ở trong các nghiên cứu tại các bệnh viện [125, 199, 232, 272]. ST273 chỉ thấy ở 1 nghiên cứu [124]. Trong khi ST1886 chưa thấy xuất hiện trong các số liệu nghiên cứu tại Việt Nam mà xuất hiện ở nước láng giềng Trung Quốc [299].

ST15 là một loài đa kháng thuốc nguy cơ cao với các gen mã hoá carbapenem như blaKPCs, blaNDMs hay blaOXAs. Các vụ dịch do ST15 OXA-

48 gây ra được báo cáo ở Pháp và Tây Ban Nha sau đó năm 2005 Diancourt và cộng sự đã phát hiện ST15 có mặt ở một số nước châu Âu khác và sau đó chủng này đã lan ra khắp thế giới [158]. Các chủng ST15 phân lập thường mang các gen sinh ESBL bao gồm CTX-M, SHV-28 các biến chủng TEM và quan trọng là mang các gen mã hoá sinh carbapenem khác nhau như KPCs, OXA-48, NDMs and VIM-4 [222]. Tại Việt Nam, năm 2017 tác giả Tatsuya Tada và cộng sự thực hiện nghiên cứu NGS trên các chủng *K.pneumoniae* phân lập tại một bệnh viện cho thấy sự xuất hiện của đa số ST15 [257]. Các nghiên cứu gần đây tiếp tục chứng minh sự tồn tại của ST15 trong bệnh viện trên khắp cả nước. Các chủng ST15 này mang nhiều các gen kháng khác nhau và đặc biệt các gen sinh carbapenem như KPC, NDM-1, NDM-4, OXA [125, 199, 232, 272]. **Trong nghiên cứu này của chúng tôi, sự xuất hiện của ST15 mang gen NDM-4 và mang nhiều loại gen kháng nhiều nhóm kháng sinh khác nhau như betalactamase, quinolon... , tại cộng đồng chứng tỏ có lây lan nhất định giữa các chủng tại bệnh viện và cộng đồng tại Việt Nam.** Hai chủng ST15 mang các gen kháng trên các plasmid khác nhau cho thấy rằng plasmid này được thu nhận một cách độc lập không liên quan về mặt phát sinh loài, ổ chứa và đặc điểm sinh học của plasmid kháng carbapenem này cần được nghiên cứu thêm, vì những plasmid như vậy có thể lây lan sang các dòng *K. pneumoniae* khác hoặc các thành viên của *Enterobacteriaceae* thông qua truyền ngang.

Đặc biệt, ST16 cũng được báo cáo gần đây ở hai vụ dịch tại 1 bệnh viện miền Nam của Việt Nam và trước đây từ cùng một bệnh viện vào năm 2013 và 2014, cũng như các bệnh viện khác ở miền Nam Việt Nam [199]. Về mặt lâm sàng tại bệnh viện cho thấy các chủng *K.pneumoniae* ST16 đa kháng gây tử vong cao. Điều quan trọng là chủng *K.pneumoniae* ST16 phát hiện từ nghiên cứu của chúng tôi cũng mang gen kháng carbapenem OXA-181 tương tự như chủng phân lập tại vụ dịch ở bệnh viện. Điều này chứng minh rằng ST16 này có thể đã được duy trì các bệnh viện Việt Nam và xuất hiện cả ở cộng đồng, đặc biệt là khu vực miền Nam. Việc thường xuyên chuyển người bệnh nặng qua các khoa khác nhau trong cùng một bệnh viện và giữa các bệnh viện khác nhau có thể là một yếu tố quan trọng góp phần lây truyền mầm bệnh này. Tuy nhiên các chủng ST16 phân lập từ các ổ dịch gần đây đã có khả năng kháng sâu rộng với hầu hết các loại thuốc thường được sử dụng để điều trị nhiễm trùng *K. pneumoniae* [199], điều này có

thể là do sự thích nghi lâu dài với việc sử dụng KS trong bệnh viện. Trong nghiên cứu này, việc tìm thấy ST16 trong cộng đồng làm tăng thêm sự lo ngại về chủng ST16 đa kháng xuất hiện và lan truyền trong cộng đồng và là mối quan tâm lớn của vấn đề y tế công cộng. Hơn nữa chủng phân lập được từ nghiên cứu của chúng tôi mang plasmid IncX3, trong khi chủng từ hai hai vụ bùng phát thuộc các dòng khác nhau và cả hai đều chứa plasmid IncF/bla OXA-181. Điều đó cho thấy rằng plasmid này được thu nhận một cách độc lập không liên quan về mặt phát sinh loài, ổ chứa và đặc điểm sinh học của plasmid kháng carbapenem này cần được nghiên cứu thêm, vì những plasmid như vậy có thể lây lan sang các dòng *K. pneumoniae* khác hoặc các thành viên của *Enterobacteriaceae* thông qua truyền ngang. Đến nay, *K. pneumoniae* ST16 không phải là một chủng thường được báo cáo; tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây cho thấy ST16 là một chủng quốc tế mới nổi thường xuyên biểu hiện tình trạng kháng carbapenems, và là nguyên nhân gây ra một số đợt bùng phát bệnh viện với tỷ lệ tử vong lên đến 75% [46, 105]. Hiện nay, người ta biết rất ít về cấu trúc quần thể và các yếu tố dịch tễ học tạo điều kiện cho sự lây lan của chủng này. Do đó, cần ưu tiên điều tra thêm các chủng hồi cứu tại các bệnh viện ở các địa phương khác và phát triển giám sát dựa trên mạng lưới bệnh viện và cộng đồng để theo dõi sự tiến triển và lây truyền của chủng ST16 và các các chủng nguy cơ cao quan trọng về mặt dịch tễ học và lâm sàng.

Khác với sự phổ biến của ST15, ST16 thì ST273 là chủng xuất hiện rải rác ở một số quốc gia. Tuy nhiên gần đây ST273 đã xuất hiện tại Philippines, quốc gia láng giềng Trung Quốc và tại một bệnh viện ở Việt Nam [87, 124, 167]. Tuy nhiên ở các quốc gia này, cũng chỉ có báo cáo ca bệnh. Ca bệnh tại Philippines là một nhiễm trùng bệnh viện với *K. pneumoniae* kháng carbapenem. Phân tích chủng này cho thấy chủng ST273 mang các gen mã hoá sinh carbapenemase khác nhau, bao gồm *blaKPC*, *blaNDM-1*, và *blaVIM*, và được công nhận ST273 là có khả năng gây dịch cao [87]. Trong khi đó phân tích ca bệnh tại Trung Quốc gần đây cho thấy chủng thuộc ST273 có mang gen *blaNDM-1* và *blaIMP-4*. Bên cạnh đó, chủng này còn mang 24 gen KKS của các nhóm khác nhau bao gồm kháng aminoglycoside (*aac* (3) -IIId, *ant* (3 ") -Ih-*aac* (6 ') -IIId, *aacA4*, *aadA1*, *aadA16*, *aph* (3 ') -Ia, *strA* và *strB*), β -lactam (*blaCTX-M-3* và *blaSHV-115*), fosfomicin (*fosA*), macrolit (*mph* (A)), phenicol (*floR*), quinolon (*oqxA*, *oqxB*, *qnrB* và *qnrS1*), rifampin (*arr3*), tetracycline (*tet* (A)), sulfonamides (*sul1* và *sul2*) và

trimethoprim (dfrA7, dfrA14 và dfrA27). Báo cáo ca ở Việt Nam của tác giả Aki và cộng sự cho thấy chủng thuộc ST273 mang gen tmexCD1-toprJ1 kháng tetracycline[124]. Tại nghiên cứu của chúng tôi, **chủng *K.pneumoniae* thuộc ST273 mang cả gen mã hoá sinh carbapenemase là NDM-4 và 11 gen khác nhau** bao gồm gen kháng aminoglycoside (aph (3') - Ib, aph(6)-Id, rmtB,], β -lactam (blaTEM-1 và blaSHV-67), fosfomycin (fosA6), macrolit [mph (A)], phenicol (floR), quinolon (qnrB1, qepA1), sulfonamides (sul2). Đáng quan tâm là chủng này **kháng với tất cả các loại KS** mà nhóm nghiên cứu làm thử nghiệm, **bao gồm cả colistin**. Đây thực sự là mối quan ngại và thúc đẩy các nghiên cứu chuyên sâu hơn tìm hiểu về cơ chế kháng của chủng này để hạn chế sự lây lan trong cộng đồng và bệnh viện và tiếp tục giám sát theo dõi sự xuất hiện của các chủng này.

ST1886 được xác định lần đầu tiên tại một báo cáo của tác giả Ana M.Ocampo và cộng sự tại Colombia năm 2016 trên các mẫu thu thập tại 4 bệnh viện năm 2012-2014[203]. Sau đó **không có nhiều báo cáo về chủng mang ST1886 trên thế giới**, đến năm 2020 tại Trung quốc, tác giả Ling Zeng và cộng sự báo cáo 39 chủng phân tích tại 11 bệnh viện tại Trung Quốc từ năm 2016-2018 cho thấy ST1886 là một trong những chủng phổ biến và đứng thứ 3 sau ST11 và ST23. Trong khi các chủng này chủ yếu mang gen KPC và có 1 số mang cả hai gen KPC và NDM [299]. Chưa có nghiên cứu nào báo cáo chủng *K.pneumoniae* thuộc ST1886 tại các nghiên cứu ở cộng đồng. Trong khi nghiên cứu trên mẫu nhiễm trùng khởi phát tại cộng đồng của chúng tôi đã xuất hiện chủng *K.pneumoniae* thuộc ST1886. Đây là một người bệnh thuộc địa bàn nghiên cứu tại tỉnh Hà Nam, người bệnh có triệu chứng nhiễm trùng tiêu hoá. Phân tích NGS cho thấy chủng mang nhiều gen kháng của nhiều nhóm khác nhau bao gồm aminoglycoside (aph (3') - Ib, aph(6)-Id, AR-3,], β -lactam (blaDHA-1 và blaSHV-80), fosfomycin (fosA6), quinolon (qnrB1, qacE), trimethoprim-sulfonamides (dfrA1,sul2). Phân tích kiểu hình cho thấy đây cũng là 1 chủng đa kháng tuy nhiên vẫn còn nhạy với nhóm amikacin, meropenem và colistin. **Chúng tôi cũng không tìm thấy nghiên cứu trên bệnh viện ở Việt Nam có xuất hiện các chủng thuộc ST1886**. Do đó chúng ta cần tiếp tục thực hiện các giám sát mức độ sinh học phân tử để tìm hiểu thêm về nguồn gốc và phương thức lan truyền của chủng thuộc ST1886 này.

4.4. Hạn chế của nghiên cứu và đề xuất nghiên cứu tiếp theo

Nghiên cứu với mục tiêu triển khai ở một số tỉnh để có số liệu trên toàn quốc. Tuy nhiên do hạn chế về nguồn lực nên cỡ mẫu cho mỗi địa điểm và mỗi bệnh lựa chọn tối thiểu và nghiên cứu cần thêm điều tra viên từ các địa phương để triển khai do đó có sai số nhất định từ người thu thập thông tin do đó có một tỷ lệ nhất định số phiếu điều tra không đủ thông tin và phải loại bỏ khỏi nghiên cứu.

Do hạn chế về nguồn lực nên các xét nghiệm không có khả năng thực hiện toàn bộ, việc lựa chọn mẫu xét nghiệm có thể dẫn đến việc hạn chế nhất định về bức tranh tổng thể của cấu trúc toàn bộ hệ gen của những chủng vi khuẩn thu thập được từ nghiên cứu cũng như các vi khuẩn khác thu được từ nghiên cứu có gánh nặng bệnh tật cao.

Đây là nghiên cứu cắt ngang do đó các yếu tố liên quan có thể là những gợi ý để cho các nghiên cứu để khẳng định các mối liên quan này.

Trên cơ sở hạn chế trên, chúng tôi đề xuất các nghiên cứu sâu hơn tìm hiểu về sự khác biệt về đặc điểm sử dụng kháng sinh theo các vùng miền, đặc điểm vi khuẩn kháng kháng sinh theo các vùng miền cũng như các nghiên cứu để khẳng định các mối liên quan để đưa ra các bằng chứng cho việc lập chính sách một cách xác thực.

Cần thực hiện tiếp các nghiên cứu sinh học phân và kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn thu thập được từ nghiên cứu để thấy rõ hơn gánh nặng về kháng kháng sinh tại cộng đồng.

4.5. Đóng góp của nghiên cứu

Đây là nghiên cứu đầu tiên của Việt Nam nghiên cứu trên người bệnh nhiễm trùng cộng đồng trên nhiều địa điểm khác nhau của cả 3 miền Bắc, miền Trung và miền Nam và đánh giá ở các khía cạnh y tế công cộng khác nhau bao gồm kiến thức về kháng sinh và thực hành sử dụng kháng sinh tại cộng đồng, đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *E.coli* và *Klebsiella* spp. bao gồm các yếu tố về kiểu gen, kiểu hình và loài.

Nghiên cứu đã cho thấy bức tranh về các gen kháng thuốc và mức độ kháng với các loại kháng sinh của hai loài vi khuẩn phổ biến và quan trọng ở cộng đồng.

Nghiên cứu đã cho kết quả về kiến thức của người dân về sử dụng kháng sinh, một yếu tố quan trọng góp phần vào việc sử dụng kháng sinh hợp lý và giảm sử dụng kháng sinh trong cộng đồng.

Nghiên cứu đã xác định được một số các ST của các chủng *E. coli*, *Klebsiella pneumonia* mang gen mã hoá sinh ESBLs, carbapenemase đang lưu hành trong cộng đồng và những gợi ý cho mối liên quan giữa các chủng đã lưu hành hiện tại ở cộng đồng và bệnh viện. Đây có thể là một bằng chứng để xây dựng các chính sách và can thiệp tổng thể ở cả bệnh viện và cộng đồng.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu *thực trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn ở người bệnh đến khám tại trạm y tế xã ở Việt Nam* chúng tôi có kết luận sau đây:

1. **Đặc điểm kháng kháng sinh của một số loại vi khuẩn thường gặp của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã một số tỉnh Việt Nam năm 2018-2019:** Vi khuẩn *E.coli* và vi khuẩn *Klebsiella spp.* là 2 trong các vi khuẩn kháng kháng sinh phổ biến tại cộng đồng.
 - **Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *E.coli* phân lập được từ nhiễm trùng cộng đồng.**
 - *E.coli* mang gen kháng kháng sinh trong các mẫu phân lập từ các nhiễm trùng tại cộng đồng có tỷ lệ cao và mang nhiều gen kháng các nhóm kháng sinh khác nhau và có sự khác nhau ở các miền: 60,8 % chủng *E.coli* mang gen kháng kháng sinh. Tỷ lệ *E. coli* sinh ESBLs khác nhau giữa các địa phương: ở miền Nam (30%), miền Bắc (71,7%) và miền Trung (61,1%). Đặc biệt có một tỷ lệ nhất định (4,6%) mang gen mã hoá sinh carbapenemase.
 - *E.coli* kháng cao với nhiều loại kháng sinh hiện đang sử dụng tại cộng đồng và bệnh viện: 92,3% kháng với ampicillin, 72,1% kháng với cefotaxime, 38,5% vi khuẩn *E.coli* kháng với ciprofloxacin và 16,3% ở trung gian, tỷ lệ kháng khá cao 55,2% với sulfamethoxazole + trimethoprim với.
 - **Đặc điểm kháng kháng sinh của vi khuẩn *Klebsiella spp.* phân lập được từ nhiễm trùng cộng đồng.**
 - Tỷ lệ mang gen kháng kháng sinh tại các *Klebsiella spp.* thu thập từ các nhiễm trùng khởi phát tại cộng đồng rất cao 88,2%, bao gồm gen mã hoá sinh ESBLs- SHV, TEM và CTX-M và gen mã hoá sinh carbapenemase lên tới 21%. Ngoài ra còn mang nhiều gen kháng kháng sinh ở các nhóm khác như OXA, tet, sul, mph.
 - *Klebsiella spp.* phân lập được từ các nhiễm trùng cộng đồng kháng với các loại kháng sinh đang sử dụng rất cao: hoàn toàn kháng với ampicillin và 2/3 kháng với amoxicillin + clavulanic; 37,3% - 49% kháng với cephalosporin thế hệ 3; Đáng chú ý là 13,7% kháng với meropenem, một kháng sinh nhóm carbapenem.

Điều kiện sinh hoạt, vệ sinh môi trường, vai trò của hiệu thuốc tại cộng đồng là những yếu tố có liên quan đến nguy cơ mang gen kháng kháng sinh ở cộng đồng.

2. Kiến thức sử dụng kháng sinh của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã một số tỉnh Việt Nam năm 2018-2019.

- Kiến thức về sử dụng kháng sinh ở người tham gia nghiên cứu còn hạn chế 64% số người được hỏi có kiến thức chưa đạt so với đánh giá.
- Thực trạng sử dụng kháng sinh ở cộng đồng khá phổ biến: 37,5% số người được hỏi có sử dụng kháng sinh và 30% người sử dụng kháng sinh không theo đơn của bác sĩ. Sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi cũng phổ biến 37,6%, trong đó ở miền Trung 77,7% sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi để phòng bệnh.

3. Môi liên quan về kiểu gen giữa các chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBLs phân lập được của người bệnh đến khám tại trạm y tế xã một số tỉnh Việt Nam năm 2018-2019.

- Có những mối liên quan nhất định về kiểu gen và ST giữa một số chủng phân lập được trong nghiên cứu, bao gồm cả trên cùng địa phương (Hải Dương) và khác địa phương (chủng từ Khánh Hoà và Hà Nội; chủng Hà Nội và Hà Nam). Các ST này cũng là các ST có mặt trên thế giới và Việt Nam. Chứng minh rằng các chủng này có mặt ở một số địa phương và có sự lây lan các chủng này ở bệnh viện ra cộng đồng hoặc ngay trong cộng đồng. Các chủng này cũng là các chủng đã xuất hiện trong các nghiên cứu tại cộng đồng trên cả mẫu người và vật nuôi.
- Một số chủng *K.pneumoniae* mang gen NDM-4 thuộc các ST xuất hiện ở một số vụ dịch gần đây ở bệnh viện của các miền. Các nhiễm khuẩn này đều đa kháng và toàn kháng và có tỷ lệ tử vong cao.

KHUYẾN NGHỊ

Thực trạng các vi khuẩn gây nhiễm trùng phổ biến ở cộng đồng có tỷ lệ mang gen kháng kháng sinh và kháng, đa kháng với các loại kháng sinh rất cao. Bên cạnh đó là sự lan truyền của vi khuẩn kháng thuốc phức tạp trong các nguồn lây khác nhau từ bệnh viện, người dân ở cộng đồng, động vật nuôi và môi trường. Tỷ lệ cao người dân có kiến thức và thực hành chưa đúng về kháng sinh và sử dụng kháng sinh còn cao và có sự khác biệt rõ ràng giữa các vùng miền của Việt Nam, do đó:

- Cần đưa chương trình giám sát cộng đồng vào chiến lược phòng chống kháng thuốc quốc gia trong giai đoạn tới. Chương trình giám sát cần có tính đại diện về không gian và thời gian để theo dõi sự thay đổi về mức độ kháng, mức độ lan truyền, phương thức lan truyền để có các biện pháp can thiệp phù hợp. Cần xây dựng các chương trình truyền thông cho người dân, người bán thuốc về việc sử dụng kháng sinh hợp lý và theo đơn của bác sỹ.
- Các thông tin, số liệu nghiên cứu về kháng kháng sinh ở cộng đồng cần được đưa các bác sỹ lâm sàng để tham khảo, trong bối cảnh tại nước ta không có kết quả xét nghiệm vi sinh trong điều trị nhiễm khuẩn ở một số bệnh viện tuyến tỉnh, các bệnh viện tuyến huyện, trạm y tế xã để có thể kê đơn điều trị cho bệnh nhân hiệu quả hơn.
- Tiếp tục thực hiện các nghiên cứu về cách thức lan truyền, biến đổi của các vi khuẩn kháng thuốc; truyền tải các kết quả nghiên cứu đến các nhà hoạch định chính sách và bác sỹ lâm sàng và xây dựng các chương trình can thiệp hiệu quả.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI LUẬN ÁN

1. **Trần Thị Mai Hưng**, Trần Huy Hoàng, Dương Thị Hồng, Nguyễn Trần Hiền, Lương Minh Tân, Nguyễn Thị Lan Phương, Nguyễn Thị Minh, Hồ Hoàng Dung, Nguyễn Thị Lan Anh, Đặng Đức Anh (2020): Kiến thức, thực hành về sử dụng kháng sinh của người bệnh tại trạm y tế xã của một số vùng miền Việt Nam năm 2018 – 2019. *Tạp chí y học Dự phòng*, tập 30 (10): 84-93.
2. **Trần Thị Mai Hưng**, Dương Thị Hồng, Lương Minh Tân, Lê Thị Trang, Phạm Duy Thái, Hồ Hoàng Dung, Nguyễn Thị Lan Phương, Nguyễn Thị Minh, Khương Thị Tâm, Đặng Đức Anh, Trần Huy Hoàng (2021): Tỷ lệ *Escherichia coli* mang gen mã hóa sinh ESBL ở người bệnh mắc một số bệnh thông thường đến khám tại tuyến y tế cơ sở ở một số tỉnh, thành phố của Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, tập 63 (12): 19-25

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Trần Diệu Linh và các cộng sự. (2018), "Vi khuẩn Gram âm mang gen mã hoá enzyme carbapenemase phân lập tại bệnh viện Trung ương Quân đội 108 trong giai đoạn từ 2014 đến 2015", *Tạp chí y học dự phòng*. 28(1), tr. 45.
2. Bộ môn Dược lý Đại học Y Hà Nội (2004), *Dược lý học lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học, tr. 241-269.
3. Bộ môn Vi sinh vật Đại học Y Hà Nội (2007), *Vi sinh vật y học*, Nhà xuất bản Y học tr. 50-57.
4. Lê Thanh Điền (2017), "Tình hình đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *Escherichia coli* và *Klebsiella pneumoniae* tại Bệnh viện Nguyễn Đình Chiểu, Bến Tre", *Tạp chí Y học Dự phòng Việt Nam*. 27(11).
5. Trần Đỗ Hùng Hà Vũ Minh Trang (2013), "Khảo sát sự kháng kháng sinh và sinh men β -lactamase của *E. coli* gây tiêu chảy ở trẻ em", *Y học Thực hành*.
6. Tống Phi Khanh và cs Lê Kim Ngọc Giao (2010), "Trực khuẩn đường ruột tiết B- lactamase phổ rộng (ESBL) phân lập ở sinh viên và nhân viên Y tế", *Tạp chí y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 14(4), tr. 4.
7. Nguyễn Thanh Bảo Mai Văn Tuấn (2008), "Khảo sát trực khuẩn Gram âm sinh men lactamase phổ rộng phân lập tại bệnh viện Trung ương Huế", *Tạp chí Y học TP HCM*. 12(1), tr. 7.
8. Quốc hội Việt Nam (2018), Luật Chăn nuôi số: 32/2018/QH14, chủ biên.
9. Nguyễn Văn Việt Nguyễn Thái Sơn, và cs (2010), "Nghiên cứu đặc điểm kháng kháng sinh của các vi khuẩn sinh ESBL phân lập được tại Bệnh viện 103 giai đoạn 2007 – 2009", *Tạp Chí Y Dược học quân sự*, tr. 9.
10. Nguyễn Thị Hân Phạm Ngọc Kiều (2012), "Khảo sát vi khuẩn gram âm sinh men beta lactamase phổ rộng phân lập tại Bệnh viện đa khoa trung tâm An giang", *Kỷ yếu HNKH 10/2012 Bệnh viện An Giang*, tr. 8.
11. Nguyễn Đắc Trung (2013), ""Đặc điểm kháng kháng sinh và khả năng sinh men β -lactamase của một số chủng *E. coli* và *Klebsiella*""", *Tạp chí Khoa học và công nghệ*. 118(4), tr. 4.

12. Ngô Thị Quỳnh Hoa và cs Võ Thị Chi Mai (2010), "Trực khuẩn đường ruột tiết β -lactamase phổ rộng (ESBL) gây nhiễm khuẩn và chiếm cứ đường ruột phân lập tại bệnh viện chợ rẫy", *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 14(2), tr. 5.
13. Phạm Ngọc Khải Không Thị Điệp, Hoàng Thị Thu Hà (2019), "Thực trạng escherichia coli sinh beta-lactamase phổ mở rộng ở người khỏe mạnh tại cộng đồng xã nguyên xá, huyện vũ thư, tỉnh thái bình, năm 2016", *Tạp chí Y học Dự phòng Việt Nam*. 12 2019(Tập số 29).
14. WHO *Diarrhoea* truy cập ngày-2018, tại trang web https://www.who.int/health-topics/diarrhoea#tab=tab_2.
15. A Fleming : (1945.), "Penicillin, Nobel Lecture December 11, 1945".
16. GS Bezanson, R Khakhria và E Bollegraaf (1983), "Nosocomial outbreak caused by antibiotic-resistant strain of Salmonella typhimurium acquired from dairy cattle", *Canadian Medical Association Journal*. 128(4), tr. 426.
17. CLSI Breakpoints (2011), "CLSI Performance standards for antimicrobial susceptibility testing", *Nineteenth informational supplement CLSI document M100-S21 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute*.
18. Alessandra Carattoli (2009), "Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 53(6), tr. 2227-2238.
19. Alessandra Carattoli và các cộng sự. (2005), "Identification of plasmids by PCR-based replicon typing", *Journal of microbiological methods*. 63(3), tr. 219-228.
20. CLSI (2010), *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twentieth informational supplement M100-S20, M100-S20*.
21. Johna CB DeNap và Paul J Hergenrother (2005), "Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drug-resistant bacteria", *Organic & biomolecular chemistry*. 3(6), tr. 959-966.
22. Linda Hadjadj và các cộng sự. (2019), "How to discover new antibiotic resistance genes?", *Expert review of molecular diagnostics*. 19(4), tr. 349-362.
23. Karthikeyan K Kumarasamy và các cộng sự. (2010), "Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study", *The Lancet infectious diseases*. 10(9), tr. 597-602.

24. Geraldine Marcadé và các cộng sự. (2008), "Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases", *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 63(1), tr. 67-71.
25. Nguyen Thi Khanh Nhu và các cộng sự. (2010), "The sudden dominance of blaCTX-M harbouring plasmids in *Shigella* spp. circulating in Southern Vietnam", *PLoS neglected tropical diseases*. 4(6), tr. e702.
26. Yvonne Pfeifer và các cộng sự. (2012), "Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in German hospitals", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, tr. AAC. 05315-11.
27. S Stefani, A Agodi và G Russo (1994), "Role of molecular methodologies in the epidemiologic study of infections", *Igiene Moderna*. 102, tr. 181-181.
28. Fred C Tenover và các cộng sự. (1995), "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing", *Journal of clinical microbiology*. 33(9), tr. 2233.
29. European Centre for Disease Prevention and Control and European Medicines Agency (2009) (2009), *ECDC/EMA joint technical report the bacterial challenge: Time to react 2009*, truy cập ngày, tại trang web http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf.
30. S. Abdul-Razak và các cộng sự. (2016), "Prevalence, awareness, treatment, control and socio demographic determinants of hypertension in Malaysian adults", *BMC Public Health*. 16, tr. 351.
31. Abubaker A Abujnah và các cộng sự. (2015), "Multidrug resistance and extended-spectrum β -lactamases genes among *Escherichia coli* from patients with urinary tract infections in Northwestern Libya", *Libyan Journal of Medicine*. 10(1).
32. M Iqbal Afridi và các cộng sự. (2015), "Prevalence and pattern of self-medication in Karachi: A community survey", *Pakistan journal of medical sciences*. 31(5), tr. 1241.
33. Akram Ahmad và các cộng sự. (2012), "Evaluation of self medication antibiotics use pattern among patients attending community pharmacies in rural India", *Journal of Pharmacy Research*. 5(2), tr. 765-768.
34. Nayeem Ahmad và các cộng sự. (2018), "Occurrence of bla NDM variants among Enterobacteriaceae from a neonatal intensive care unit in a northern India hospital", *Frontiers in microbiology*. 9, tr. 407.

35. S. Ahmed và các cộng sự. (2016), "Challenges in Implementation of the ANISA Protocol at the Matiari Site, Pakistan", *Pediatr Infect Dis J.* 35(5 Suppl 1), tr. S65-9.
36. Shahana Ahmed, John E Olsen và Ana Herrero-Fresno (2017), "The genetic diversity of commensal *Escherichia coli* strains isolated from non-antimicrobial treated pigs varies according to age group", *PLoS One.* 12(5), tr. e0178623.
37. A. M. Akhtar và các cộng sự. (2016), "Prevalence and drug resistance pattern of MDR TB in retreatment cases of Punjab, Pakistan", *J Pak Med Assoc.* 66(8), tr. 989-93.
38. Nashwan Al Naiemi và các cộng sự. (2008), "Extended-spectrum-beta-lactamase production in a *Salmonella enterica* serotype Typhi strain from the Philippines", *Journal of Clinical Microbiology.* 46(8), tr. 2794-2795.
39. Abdulrahman Al Rasheed và các cộng sự. (2016), "Prevalence and predictors of self-medication with antibiotics in Al Wazarat Health Center, Riyadh City, KSA", *BioMed research international.* 2016.
40. Werner C Albrich, Dominique L Monnet và Stephan Harbarth (2004), "Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*", *Emerging infectious diseases.* 10(3), tr. 514.
41. Mamoon A Aldeyab và các cộng sự. (2008), "Modelling the impact of antibiotic use and infection control practices on the incidence of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a time-series analysis", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 62(3), tr. 593-600.
42. Nerino Allocati và các cộng sự. (2013), "*Escherichia coli* in Europe: an overview", *International journal of environmental research and public health.* 10(12), tr. 6235-6254.
43. Gerardo Alvarez-Uria và các cộng sự. (2018), "Global forecast of antimicrobial resistance in invasive isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*", *International Journal of Infectious Diseases.* 68, tr. 50-53.
44. Infectious Diseases Society of America (2011), "Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives", *Clinical Infectious Diseases.* 52(suppl_5), tr. S397-S428.
45. Malin André và các cộng sự. (2010), "A survey of public knowledge and awareness related to antibiotic use and resistance in Sweden", *Journal of Antimicrobial chemotherapy.* 65(6), tr. 1292-1296.

46. Diego O Andrey và các cộng sự. (2020), "An Emerging Clone, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2–Producing *K. pneumoniae* Sequence Type 16, Associated With High Mortality Rates in a CC258-Endemic Setting", *Clinical Infectious Diseases*. 71(7), tr. e141-e150.
47. Shamshul Ansari và các cộng sự. (2015), "Community acquired multi-drug resistant clinical isolates of *Escherichia coli* in a tertiary care center of Nepal", *Antimicrobial resistance and infection control*. 4(1), tr. 1-8.
48. M. Arici (2016), "Ssa 02-1 Salt and Hypertension in Middle East", *J Hypertens*. 34 Suppl 1 - ISH 2016 Abstract Book, tr. e2.
49. T. Arikoglu và các cộng sự. (2016), "The characteristics of indoor and outdoor fungi and their relation with allergic respiratory diseases in the southern region of Turkey", *Environ Monit Assess*. 188(6), tr. 380.
50. Abdelmoneim Ismail Awad và Esraa Abdulwahid Aboud (2015), "Knowledge, attitude and practice towards antibiotic use among the public in Kuwait", *PloS one*. 10(2), tr. e0117910.
51. Mabel Kamweli Aworh và các cộng sự. (2021), "Genetic relatedness of multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from humans, chickens and poultry environments", *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 10(1), tr. 1-13.
52. James A Ayukekbong, Michel Ntemgwa và Andrew N Atabe (2017), "The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies", *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 6(1), tr. 1-8.
53. S. Babypadmini và B. Appalaraju (2004), "Extended spectrum-lactamases in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*-prevalence and susceptibility pattern in a tertiary care hospital", *Indian Journal of Medical Microbiology*. 22(3), tr. 172.
54. EB Bali, L Açık và N Sultan (2010), "Phenotypic and molecular characterization of SHV produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital", *Afr J Microbiol Res*. 4, tr. 650-654.
55. Arta Balode, Volga Punda-Polić và Michael J. Dowzicky (2013), "Antimicrobial susceptibility of gram-negative and gram-positive bacteria collected from countries in Eastern Europe: results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST) 2004–2010", *International journal of antimicrobial agents*. 41(6), tr. 527-535.

56. Fernando Baquero, José-Luis Martínez và Rafael Cantón (2008), "Antibiotics and antibiotic resistance in water environments", *Current opinion in biotechnology*. 19(3), tr. 260-265.
57. JD Baumgartner và MP Glauser (1983), "Comparative study of imipenem in severe infections", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 12(suppl_D), tr. 141-148.
58. Jan M. Bell, John D. Turnidge và Sentry Apac Participants (2002), "High prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Asia-Pacific and South Africa: results from SENTRY antimicrobial surveillance program, 1998-1999", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 46(3), tr. 879-881.
59. Kim W. Benner, Priya Prabhakaran và Autumn S. Lowros (2014), "Epidemiology of infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in a pediatric intensive care unit", *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*. 19(2), tr. 83-90.
60. Kerlly J Bernabe và các cộng sự. (2017), "Antimicrobial resistance in West Africa: a systematic review and meta-analysis", *International journal of antimicrobial agents*. 50(5), tr. 629-639.
61. Mohitosh Biswas và các cộng sự. (2014), "Self medicated antibiotics in Bangladesh: a cross-sectional health survey conducted in the Rajshahi City", *BMC public health*. 14(1), tr. 1-7.
62. Sam K Bouchillon và các cộng sự. (2013), "Antimicrobial susceptibility of inpatient urinary tract isolates of Gram-negative bacilli in the United States: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) Program: 2009– 2011", *Clinical therapeutics*. 35(6), tr. 872-877.
63. Patricia A Bradford (2001), "Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat", *Clinical microbiology reviews*. 14(4), tr. 933-951.
64. Sylvain Brisse và Jan Verhoef (2001), "Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping", *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 51(3), tr. 915-924.
65. Annie J Browne và các cộng sự. (2021), "Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study", *The Lancet Planetary Health*. 5(12), tr. e893-e904.

66. Ashley Bryce và các cộng sự. (2016), "Global prevalence of antibiotic resistance in paediatric urinary tract infections caused by *Escherichia coli* and association with routine use of antibiotics in primary care: systematic review and meta-analysis", *bmj*. 352.
67. Karen Bush và George A Jacoby (2010), "Updated functional classification of β -lactamases", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 54(3), tr. 969-976.
68. Esther Calbo và Javier Garau (2015), "The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation", *Future microbiology*. 10(6), tr. 1063-1075.
69. Anaelís C Campos và các cộng sự. (2016), "Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: a systematic review", *American journal of infection control*. 44(11), tr. 1374-1380.
70. Cátia Caneiras và các cộng sự. (2019), "Community-and hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infections in Portugal: virulence and antibiotic resistance", *Microorganisms*. 7(5), tr. 138.
71. Rafael Cantón và các cộng sự. (2008), "Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe", *Clinical Microbiology and infection*. 14, tr. 144-153.
72. US CDC *Antibiotic prescribing and use*, truy cập ngày, tại trang web <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/uti.html>.
73. US CDC *Pneumococcal Disease* truy cập ngày-2018, tại trang web <https://www.cdc.gov/pneumococcal/about/symptoms-complications.html>.
74. U.S. Department of Health and Human Services Center for Disease Controls and Prevention (2013), *Antibiotic resistance threats in the United States, 2013*, truy cập ngày, tại trang web <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
75. Muge Cevik, CGG Bamford và Antonia Ho (2020), "COVID-19 pandemic—a focused review for clinicians", *Clinical Microbiology and Infection*. 26(7), tr. 842-847.
76. Jie Chang và các cộng sự. (2018), "Non-prescription use of antibiotics among children in urban China: a cross-sectional survey of knowledge, attitudes, and practices", *Expert review of anti-infective therapy*. 16(2), tr. 163-172.
77. Ya-Ting Chang và các cộng sự. (2017), "Epidemiology and trends in the antibiotic susceptibilities of Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-

abdominal infections in the Asia-Pacific region, 2010–2013", *International journal of antimicrobial agents*. 49(6), tr. 734-739.

78. Sunicha Chanvatik và các cộng sự. (2019), "Knowledge and use of antibiotics in Thailand: A 2017 national household survey", *PloS one*. 14(8), tr. e0220990.

79. E Chaslus-Dancla và các cộng sự. (1989), "Detection of apramycin resistant Enterobacteriaceae in hospital isolates", *FEMS microbiology letters*. 61(3), tr. 261-265.

80. E Chaslus-Dancla và các cộng sự. (1991), "High genetic homology between plasmids of human and animal origins conferring resistance to the aminoglycosides gentamicin and apramycin", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 35(3), tr. 590-593.

81. Elisabeth Chaslus-Dancla và các cộng sự. (1986), "Emergence of aminoglycoside 3-N-acetyltransferase IV in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* isolated from animals in France", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 29(2), tr. 239-243.

82. Liang Chen và các cộng sự. (2014), "Epidemic *Klebsiella pneumoniae* ST258 is a hybrid strain", *MBio*. 5(3), tr. e01355-14.

83. Li Cheng và các cộng sự. (2016), "Clonal dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone with high prevalence of *oqxAB* and *rmtB* in a tertiary hospital in China: results from a 3-year period", *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 15(1), tr. 1.

84. Yong Chong, Yoshikiyo Ito và Tomohiko Kamimura (2011), "Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*", *Infection, Genetics and Evolution*. 11(7), tr. 1499-1504.

85. Yong Chong, Shinji Shimoda và Nobuyuki Shimono (2018), "Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*", *Infection, Genetics and Evolution*. 61, tr. 185-188.

86. Yong Chong và các cộng sự. (2013), "Community spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*: a long-term study in Japan", *Journal of medical microbiology*. 62(7), tr. 1038-1043.

87. Andrew Chou và các cộng sự. (2016), "Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST273 carrying *bla* NDM-7 and ST656 carrying *bla* NDM-1 in Manila, Philippines", *Microbial Drug Resistance*. 22(7), tr. 585-588.

88. Peter Collignon và các cộng sự. (2018), "Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis", *The Lancet Planetary Health*. 2(9), tr. e398-e405.
89. European Commission, "Special Eurobarometer 478 "Antimicrobial Resistance" Report".
90. European Commission (2016), Special eurobarometer 445: Antimicrobial resistance, chủ biên, European Commission Brussels, Belgium.
91. Centers for Disease Control và Prevention (2019), *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*, US Department of Health and Human Services, Centres for Disease Control and
92. Gemma Croxall và các cộng sự. (2011), "Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from a regional cohort of elderly patients highlights the prevalence of ST131 strains with increased antimicrobial resistance in both community and hospital care settings", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66(11), tr. 2501-2508.
93. Luis E Cuellar và các cộng sự. (2008), "Device-associated infection rates and mortality in intensive care units of Peruvian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium", *Revista Panamericana de Salud Pública*. 24, tr. 16-24.
94. Zeljko Cvetnić và các cộng sự. (2021), "Antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from urine in hospital patients and outpatients", *Archives of Biotechnology and Biomedicine*. 5(1), tr. 001-007.
95. Vu Quoc Dat và các cộng sự. (2017), "Bacterial bloodstream infections in a tertiary infectious diseases hospital in Northern Vietnam: aetiology, drug resistance, and treatment outcome", *BMC infectious diseases*. 17(1), tr. 493.
96. Peter Davey, C Pagliari và A Hayes (2002), "The patient's role in the spread and control of bacterial resistance to antibiotics", *Clinical Microbiology and Infection*. 8, tr. 43-68.
97. Leimapokpam Sumitra Devi và các cộng sự. (2020), "Increasing prevalence of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase, carbapenemase, and NDM-1 in patients from a rural community with community acquired infections: A 3-year study", *International Journal of Applied and Basic Medical Research*. 10(3), tr. 156.

98. Hung Do Tran và các cộng sự. (2022), "A cross-sectional study of the antibiotic resistant prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Vietnam", *Journal of Health Sciences*.
99. Y Doi và các cộng sự. (2010), "Extended-spectrum and CMY-type β -lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain", *Clinical Microbiology and Infection*. 16(1), tr. 33-38.
100. Shanta Dutta và các cộng sự. (2008), "Emergence of highly fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi in a community-based fever surveillance from Kolkata, India", *International journal of antimicrobial agents*. 31(4), tr. 387-389.
101. Jodi Vanden Eng và các cộng sự. (2003), "Consumer attitudes and use of antibiotics", *Emerging infectious diseases*. 9(9), tr. 1128.
102. *EnteroBase*, truy cập ngày, tại trang web <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>.
103. Benjamin A Evans và Sebastian GB Amyes (2014), "OXA β -lactamases", *Clinical microbiology reviews*. 27(2), tr. 241-263.
104. Edward J Feil và các cộng sự. (2004), "eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data", *Journal of bacteriology*. 186(5), tr. 1518-1530.
105. Yu Feng và các cộng sự. (2020), "Handwashing sinks as the source of transmission of ST16 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, an international high-risk clone, in an intensive care unit", *Journal of Hospital Infection*. 104(4), tr. 492-496.
106. S Ferjani và các cộng sự. (2015), "A comparative study of antimicrobial resistance rates and phylogenetic groups of community-acquired versus hospital-acquired invasive *Escherichia coli*", *Médecine et Maladies Infectieuses*. 45(4), tr. 133-138.
107. Rita L Finley và các cộng sự. (2013), "The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment", *Clinical infectious diseases*. 57(5), tr. 704-710.
108. Paola Gandolfi-Decristophoris và các cộng sự. (2013), "Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthy companion animals living in nursing homes and in the community", *American journal of infection control*. 41(9), tr. 831-835.

109. N Ganesan và các cộng sự. (2014), "Self-medication and indiscriminate use of antibiotics without prescription in Chennai, India: a major public health problem", *Journal Club for Pharmaceutical Sciences*. 1(1), tr. 130-141.
110. Cristiana Garofalo và các cộng sự. (2007), "Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat", *International Journal of Food Microbiology*. 113(1), tr. 75-83.
111. GARP-Vietnam. (2011.), *Situation analysis on antibiotic resistance use in Vietnam. Global Antibiotic Resistance Partnership (GARP)-Vietnam, Hanoi, Vietnam*.
112. Ulises Garza-Ramos và các cộng sự. (2018), "Phenotypic and molecular characterization of Klebsiella spp. isolates causing community-acquired infections", *New microbes and new infections*. 23, tr. 17-27.
113. Nadine Geser và các cộng sự. (2011), "Molecular identification of blaESBL genes from Enterobacteriaceae isolated from healthy human carriers in Switzerland", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, tr. AAC-05539.
114. Herman Goossens và các cộng sự. (2005), "Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study", *The Lancet*. 365(9459), tr. 579-587.
115. Lawrence W Green và Marshall W Kreuter (1991), *Health education planning*, Mayfield Pub. Co.
116. Larissa Grigoryan và các cộng sự. (2006), "Self-medication with antimicrobial drugs in Europe", *Emerging infectious diseases*. 12(3), tr. 452.
117. Sabine Gröbner và các cộng sự. (2009), "Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum β -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates at the university hospital of Tübingen, Germany", *Journal of medical microbiology*. 58(7), tr. 912-922.
118. Usman Hadi và các cộng sự. (2008), "Survey of antibiotic use of individuals visiting public healthcare facilities in Indonesia", *International Journal of Infectious Diseases*. 12(6), tr. 622-629.
119. BNNS Halling-Sørensen và các cộng sự. (1998), "Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review", *Chemosphere*. 36(2), tr. 357-393.

120. Souheil Hallit và các cộng sự. (2020), "Practice of parents and pharmacists regarding antibiotics use in pediatrics: A 2017 cross-sectional study in Lebanese community pharmacies", *Journal of Evaluation in Clinical Practice*. 26(1), tr. 181-189.
121. Shin Haruta và các cộng sự. (2000), "Functional analysis of the active site of a metallo- β -lactamase proliferating in Japan", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 44(9), tr. 2304-2309.
122. Nancy J Hawkings, Christopher C Butler và Fiona Wood (2008), "Antibiotics in the community: a typology of user behaviours", *Patient education and counseling*. 73(1), tr. 146-152.
123. Stephen P. Hawser và các cộng sự. (2009), "Emergence of high levels of extended-spectrum- β -lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 53(8), tr. 3280-3284.
124. Aki Hirabayashi và các cộng sự. (2021), "Emergence of a plasmid-borne tigecycline resistance in *Klebsiella pneumoniae* in Vietnam", *Journal of Medical Microbiology*. 70(3), tr. 001320.
125. Aki Hirabayashi và các cộng sự. (2021), "Plasmid analysis of NDM metallo- β -lactamase-producing Enterobacterales isolated in Vietnam", *bioRxiv*, tr. 2020.03.18.996710.
126. Nguyen Quynh Hoa và các cộng sự. (2011), "Unnecessary antibiotic use for mild acute respiratory infections during 28-day follow-up of 823 children under five in rural Vietnam", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 105(11), tr. 628-636.
127. Kathryn E Holt và các cộng sự. (2015), "Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112(27), tr. E3574-E3581.
128. Po-Ren Hsueh và các cộng sự. (2011), "Consensus review of the epidemiology and appropriate antimicrobial therapy of complicated urinary tract infections in Asia-Pacific region", *Journal of infection*. 63(2), tr. 114-123.
129. I-Fei Huang và các cộng sự. (2018), "Fecal carriage of multidrug-resistant *Escherichia coli* by community children in southern Taiwan", *BMC gastroenterology*. 18(1), tr. 1-8.

130. YH Huang và các cộng sự. (2007), "Clonal spread of SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between community and hospital", *Clinical microbiology and infection*. 13(7), tr. 717-724.
131. Ruth Hummel, H Tschäpe và W Witte (1986), "Spread of plasmid-mediated nourseothricin resistance due to antibiotic use in animal husbandry", *Journal of basic microbiology*. 26(8), tr. 461-466.
132. JEB Hunter và các cộng sự. (1994), "Apramycin-resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a stockman", *Epidemiology & Infection*. 112(3), tr. 473-480.
133. Mutasim E Ibrahim và các cộng sự. (2013), "Prevalence of extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* from Hospitals in Khartoum State, Sudan", *Oman medical journal*. 28(2), tr. 116.
134. Danielle J Ingle và các cộng sự. (2018), "Dynamics of antimicrobial resistance in intestinal *Escherichia coli* from children in community settings in South Asia and sub-Saharan Africa", *Nature microbiology*. 3(9), tr. 1063-1073.
135. Jacob Stanley Iramiot và các cộng sự. (2020), "Whole genome sequences of multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated in a Pastoralist Community of Western Uganda: Phylogenomic changes, virulence and resistant genes", *PLoS One*. 15(5), tr. e0231852.
136. Sara Javidnia và các cộng sự. (2013), "Clonal dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients and the hospital environment", *International Journal of Infectious Diseases*. 17(9), tr. e691-e695.
137. Shio-Shin Jean, Po-Ren Hsueh và SMART Asia-Pacific Group (2016), "Distribution of ESBLs, AmpC β -lactamases and carbapenemases among Enterobacteriaceae isolates causing intra-abdominal and urinary tract infections in the Asia-Pacific region during 2008–14: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART)", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72(1), tr. 166-171.
138. Klaus Kaier và các cộng sự. (2009), "The impact of antimicrobial drug consumption and alcohol-based hand rub use on the emergence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing strains: a time-series analysis", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 63(3), tr. 609-614.
139. Hidayah Karuniawati và các cộng sự. (2021), "Assessment of Knowledge, Attitude, and Practice of Antibiotic Use among the Population of Boyolali, Indonesia: A Cross-Sectional Study", *International journal of environmental research and public health*. 18(16), tr. 8258.

140. Magdalena Kawalec và các cộng sự. (2001), "Outbreak of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* of the Phenotype VanB in a Hospital in Warsaw, Poland: Probable Transmission of the Resistance Determinants into an Endemic Vancomycin-Susceptible Strain", *Journal of clinical microbiology*. 39(5), tr. 1781-1787.
141. Neema Kayange và các cộng sự. (2010), "Predictors of positive blood culture and deaths among neonates with suspected neonatal sepsis in a tertiary hospital, Mwanza-Tanzania", *BMC pediatrics*. 10(1), tr. 1-9.
142. Dokyun Kim và các cộng sự. (2017), "Increasing resistance to extended-spectrum cephalosporins, fluoroquinolone, and carbapenem in Gram-negative bacilli and the emergence of carbapenem non-susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*: analysis of Korean Antimicrobial Resistance Monitoring System (KARMS) data from 2013 to 2015", *Annals of laboratory medicine*. 37(3), tr. 231-239.
143. Kyoung Young Kim, Chul Sung Kim và Dong Hoon Lim (2008), "The ciprofloxacin resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from female patients with community-acquired urinary tract infection in the Jeonnam and Gwangju region for the recent 2-years", *Korean Journal of Urology*. 49(6), tr. 540-548.
144. So Sun Kim, Seongmi Moon và Eun Jung Kim (2011), "Public knowledge and attitudes regarding antibiotic use in South Korea", *Journal of Korean Academy of Nursing*. 41(6), tr. 742-749.
145. Young Ah Kim và các cộng sự. (2017), "Community-onset extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 at two Korean community hospitals: the spread of multidrug-resistant *E. coli* to the community via healthcare facilities", *International Journal of Infectious Diseases*. 54, tr. 39-42.
146. Eili Y Klein và các cộng sự. (2018), "Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 115(15), tr. E3463-E3470.
147. C Kliebe và các cộng sự. (1985), "Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 28(2), tr. 302-307.
148. H Knothe, M Antal và V Krcméry (1987), "Imipenem and ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 19(1), tr. 136-138.
149. Eda Koksall và các cộng sự. (2019), "Investigation of risk factors for community-acquired urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* and *Klebsiella* species", *Investigative and clinical urology*. 60(1), tr. 46-53.

150. Ahmet Koluman và Abdullah Dikici (2013), "Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: status quo and global trends", *Critical Reviews in Microbiology*. 39(1), tr. 57-69.
151. Nithin Kumar và các cộng sự. (2013), "Perceptions and practices of self-medication among medical students in coastal South India", *PloS one*. 8(8), tr. e72247.
152. Kurniawan Kurniawan, Jimmy Posangi và Nancy Rampengan (2017), "Association between public knowledge regarding antibiotics and self-medication with antibiotics in Teling Atas Community Health Center, East Indonesia", *Medical Journal of Indonesia*. 26(1), tr. 62-9.
153. Mette V Larsen và các cộng sự. (2012), "Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria", *Journal of clinical microbiology*. 50(4), tr. 1355-1361.
154. Mattias Larsson và các cộng sự. (2000), "Antibiotic medication and bacterial resistance to antibiotics: a survey of children in a Vietnamese community", *Tropical Medicine & International Health*. 5(10), tr. 711-721.
155. Ebbing Lautenbach và các cộng sự. (2001), "Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes", *Clinical Infectious Diseases*. 32(8), tr. 1162-1171.
156. Ramanan Laxminarayan và các cộng sự. (2013), "Antibiotic resistance—the need for global solutions", *The Lancet infectious diseases*. 13(12), tr. 1057-1098.
157. Chang Ro Lee và các cộng sự. (2016), "Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods", *Frontiers in Microbiology*. 7(JUN), tr. 1-30.
158. Chang-Ro Lee và các cộng sự. (2016), "Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods", *Frontiers in microbiology*. 7, tr. 895.
159. Dong Sup Lee, Seung-Ju Lee và Hyun-Sop Choe (2018), "Community-acquired urinary tract infection by *Escherichia coli* in the era of antibiotic resistance", *BioMed research international*. 2018.
160. Dominique Lescure và các cộng sự. (2018), "Determinants of self-medication with antibiotics in European and Anglo-Saxon countries: a systematic review of the literature", *Frontiers in public health*. 6, tr. 370.

161. Bin Li và các cộng sự. (2011), "High prevalence of CTX-M β -lactamases in faecal *Escherichia coli* strains from healthy humans in Fuzhou, China", *Scandinavian journal of infectious diseases*. 43(3), tr. 170-174.
162. H. Li và các cộng sự. (2014), "Molecular characteristics of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in China from 2008 to 2011: predominance of KPC-2 enzyme", *Diagn Microbiol Infect Dis*. 78(1), tr. 63-5.
163. Ka Keat Lim và Chew Charn Teh (2012), "A cross sectional study of public knowledge and attitude towards antibiotics in Putrajaya, Malaysia", *Southern med review*. 5(2), tr. 26.
164. Dnyanesh Limaye và các cộng sự. (2017), "A systematic review of the literature to assess self-medication practices", *Annals of Medical and Health Sciences Research*.
165. Wu-Pu Lin và các cộng sự. (2016), "The antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* from community settings in Taiwan, a trend analysis", *Scientific reports*. 6(1), tr. 1-11.
166. Samuel Lipworth và các cộng sự. (2021), "Ten-year longitudinal molecular epidemiology study of *Escherichia coli* and *Klebsiella* species bloodstream infections in Oxfordshire, UK", *Genome medicine*. 13(1), tr. 1-13.
167. Lu Liu và các cộng sự. (2018), "Sequence type 273 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla NDM-1 and bla IMP-4", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 62(6), tr. e00160-18.
168. David M Livermore và Neil Woodford (2006), "The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*", *Trends in microbiology*. 14(9), tr. 413-420.
169. Bing Lu và các cộng sự. (2017), "Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolates from stool specimens of outpatients in sentinel hospitals Beijing, China, 2010–2015", *Gut pathogens*. 9(1), tr. 1-5.
170. Conan MacDougall và các cộng sự. (2005), "Hospital and community fluoroquinolone use and resistance in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in 17 US hospitals", *Clinical infectious diseases*. 41(4), tr. 435-440.
171. A-P Magiorakos và các cộng sự. (2012), "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance", *Clinical microbiology and infection*. 18(3), tr. 268-281.

172. Arch G Mainous, Vanessa A Diaz và Mark Carnemolla (2008), "Factors affecting Latino adults' use of antibiotics for self-medication", *The Journal of the American Board of Family Medicine*. 21(2), tr. 128-134.
173. Mohammad Reza Malekjamshidi, Hengameh Zandi và Fereshteh Eftekhar (2020), "Prevalence of Extended-Spectrum β -lactamase and Integron Gene Carriage in Multidrug-Resistant *Klebsiella* Species Isolated from Outpatients in Yazd, Iran", *Iranian journal of medical sciences*. 45(1), tr. 23.
174. Mojgan Mamani và các cộng sự. (2015), "Antibacterial susceptibility of *Escherichia coli* among outpatients with community-acquired urinary tract infection in Hamadan, Iran", *Journal of global antimicrobial resistance*. 3(1), tr. 40-43.
175. Wejdene Mansour và các cộng sự. (2015), "Dissemination of multidrug-resistant blaCTX-M-15/IncFIIk plasmids in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospital-and community-acquired human infections in Tunisia", *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 83(3), tr. 298-304.
176. M  ril Massot và các cộng sự. (2016), "Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years", *Microbiology*. 162(4), tr. 642.
177. Amy J Mathers, Gisele Peirano và Johann DD Pitout (2015), "The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae", *Clinical microbiology reviews*. 28(3), tr. 565-591.
178. Vidya Mave và các cộng sự. (2017), "High burden of antimicrobial resistance and mortality among adults and children with community-onset bacterial infections in India", *The Journal of infectious diseases*. 215(8), tr. 1312-1320.
179. Beata Mazi  nska, Izabela Stru  zycka và Waleria Hryniewicz (2017), "Surveys of public knowledge and attitudes with regard to antibiotics in Poland: Did the European Antibiotic Awareness Day campaigns change attitudes?", *PloS one*. 12(2), tr. e0172146.
180. Cliodna AM McNulty và các cộng sự. (2007), "Don't wear me out—the public's knowledge of and attitudes to antibiotic use", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 59(4), tr. 727-738.
181. Cliodna AM McNulty và các cộng sự. (2007), "The public's attitudes to and compliance with antibiotics", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 60(suppl_1), tr. i63-i68.

182. Bénédicte Melot, Julien Colot và Gilles Guerrier (2015), "Bacteremic community-acquired infections due to *Klebsiella pneumoniae*: clinical and microbiological presentation in New Caledonia, 2008–2013", *International Journal of Infectious Diseases*. 41, tr. 29-31.
183. Zengmin Miao và các cộng sự. (2017), "Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from outpatients in town hospitals of Shandong Province, China", *Frontiers in microbiology*. 8, tr. 63.
184. Nur Ain Mohd Asri và các cộng sự. (2021), "Global Prevalence of Nosocomial Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: A Systematic Review and Meta-Analysis", *Antibiotics*. 10(12), tr. 1508.
185. Dae Soo Moon và Young Jin Park (2010), "Frequency of Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase Genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* over a Three-year Period in a University Hospital in Korea", *Korean J Lab Med*. 30, tr. 616-23.
186. Mojtaba Moosavian và Behnaz Deiham (2012), "Distribution of TEM, SHV and CTX-M Genes among ESBL-producing Enterobacteriaceae isolates in Iran", *African Journal of Microbiology Research*. 6(26), tr. 5433-5439.
187. Carlos Alvarez Moreno và các cộng sự. (2006), "Device-associated infection rate and mortality in intensive care units of 9 Colombian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium", *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 27(4), tr. 349-356.
188. Ian Morrissey và các cộng sự. (2013), "A review of ten years of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) from 2002 to 2011", *Pharmaceuticals*. 6(11), tr. 1335-1346.
189. Michael R. Mulvey và các cộng sự. (2004), "Ambler class A extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian hospitals", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 48(4), tr. 1204-1214.
190. L Silvia Munoz-Price và các cộng sự. (2013), "Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases", *The Lancet infectious diseases*. 13(9), tr. 785-796.
191. Christopher JL Murray và các cộng sự. (2022), "Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis", *The Lancet*. 399(10325), tr. 629-655.

192. Christine F Najjuka và các cộng sự. (2016), "Antimicrobial susceptibility profiles of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from outpatients in urban and rural districts of Uganda", *BMC research notes*. 9(1), tr. 1-14.
193. Rika Nakama và các cộng sự. (2016), "Current status of extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* in Okinawa prefecture, Japan", *Journal of Infection and Chemotherapy*. 22(5), tr. 281-286.
194. Shiri Navon-Venezia và các cộng sự. (2003), "Occurrence and phenotypic characteristics of extended-spectrum β -lactamases among members of the family Enterobacteriaceae at the Tel-Aviv Medical Center (Israel) and evaluation of diagnostic tests", *Journal of clinical microbiology*. 41(1), tr. 155-158.
195. Shiri Navon-Venezia, Kira Kondratyeva và Alessandra Carattoli (2017), "*Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance", *FEMS microbiology reviews*. 41(3), tr. 252-275.
196. Nichola R Naylor và các cộng sự. (2018), "Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review", *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 7(1), tr. 1-17.
197. Gaurav Nepal và Shekhar Bhatta (2018), "Self-medication with antibiotics in WHO Southeast Asian Region: a systematic review", *Cureus*. 10(4).
198. Minh Ngoc Nguyen và các cộng sự. (2021), "Prospective One Health genetic surveillance in Vietnam identifies distinct blaCTX-M-harboring *Escherichia coli* in food-chain and human-derived samples", *Clinical Microbiology and Infection*. 27(10), tr. 1515. e1-1515. e8.
199. To Nguyen Thi Nguyen và các cộng sự. (2021), "Emerging carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 16 causing multiple outbreaks in a tertiary hospital in southern Vietnam", *Microbial genomics*. 7(3).
200. Marie-Hélène Nicolas-Chanoine và các cộng sự. (2012), "10-Fold increase (2006–11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68(3), tr. 562-568.
201. Pauline Norris (2007), "Interventions to improve antimicrobial use: evidence from ICIUM 2004", *Geneva: WHO*. 1.
202. Jim O'Neill (2016), "Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations".

203. Ana M Ocampo và các cộng sự. (2016), "A two-year surveillance in five Colombian tertiary care hospitals reveals high frequency of non-CG258 clones of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with distinct clinical characteristics", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 60(1), tr. 332-342.
204. Moses Ocan và các cộng sự. (2015), "Household antimicrobial self-medication: a systematic review and meta-analysis of the burden, risk factors and outcomes in developing countries", *BMC public health*. 15(1), tr. 1-11.
205. Junko Okumura, Susumu Wakai và Takusei Umenai (2002), "Drug utilisation and self-medication in rural communities in Vietnam", *Social science & medicine*. 54(12), tr. 1875-1886.
206. World Health Organization (2001), *WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*. WHO/CDS/CSR/DRS/2001, truy cập ngày, tại trang web Available:
http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/en/EGlobal_Strat.pdf. .
207. World Health Organization (2014), *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*, World Health Organization.
208. World Health Organization (2015), "Antibiotic resistance: Multi-country public awareness survey".
209. World Health Organization (2020), <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>, truy cập ngày-2021, tại trang.
210. World Health Organization (2021), "Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2021".
211. World Health Organization (2021), "WHO integrated global surveillance on ESBL-producing *E. coli* using a “One Health” approach: implementation and opportunities".
212. Kazeem A Oshikoya, Idowu O Senbanjo và Olisamedua F Njokanma (2009), "Self-medication for infants with colic in Lagos, Nigeria", *BMC pediatrics*. 9(1), tr. 1-8.
213. S. G. Parisi và các cộng sự. (2015), "Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* strains producing carbapenemases and increase of resistance to colistin in an Italian teaching hospital from January 2012 To December 2014", *BMC Infect Dis*. 15, tr. 244.

214. Ana Paula Martins và các cộng sự. (2002), "Self-medication in a Portuguese urban population: a prevalence study", *Pharmacoepidemiology and drug safety*. 11(5), tr. 409-414.
215. Ana Belén Ibarz Pavón và Martin CJ Maiden (2009), "Multilocus sequence typing", *Molecular Epidemiology of Microorganisms*, Springer, tr. 129-140.
216. Eglė Pavydė và các cộng sự. (2015), "Public Knowledge, Beliefs and Behavior on Antibiotic Use and Self-Medication in Lithuania", *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 12(6), tr. 7002-7016.
217. Zhong Peng và các cộng sự. (2022), "Antimicrobial resistance and population genomics of multidrug-resistant *Escherichia coli* in pig farms in mainland China", *Nature communications*. 13(1), tr. 1-11.
218. Federico Perez và David Van Duin (2013), "Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a menace to our most vulnerable patients", *Cleveland Clinic journal of medicine*. 80(4), tr. 225.
219. Gabriel G Perron, Graham Bell và Sylvain Quessy (2008), "Parallel evolution of multidrug-resistance in *Salmonella enterica* isolated from swine", *FEMS microbiology letters*. 281(1), tr. 17-22.
220. Alain Philippon và các cộng sự. (2016), "A structure-based classification of class A β -lactamases, a broadly diverse family of enzymes", *Clinical Microbiology Reviews*. 29(1), tr. 29-57.
221. Johann DD Pitout và các cộng sự. (2005), "Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56(1), tr. 52-59.
222. Johann DD Pitout, Patrice Nordmann và Laurent Poirel (2015), "Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 59(10), tr. 5873-5884.
223. Ronald E Polk và các cộng sự. (2004), "Predicting hospital rates of fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from fluoroquinolone use in US hospitals and their surrounding communities", *Clinical infectious diseases*. 39(4), tr. 497-503.
224. Francesca Prestinaci, Patrizio Pezzotti và Annalisa Pantosti (2015), "Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon", *Pathogens and global health*. 109(7), tr. 309-318.

225. Jingjing Quan và các cộng sự. (2016), "High prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in community-onset bloodstream infections in China", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72(1), tr. 273-280.
226. Anne Marie Queenan và Karen Bush (2007), "Carbapenemases: the versatile β -lactamases", *Clinical microbiology reviews*. 20(3), tr. 440-458.
227. Elizabeth G Ramsey và các cộng sự. (2019), "Seasonal variation in antimicrobial resistance rates of community-acquired *Escherichia coli* bloodstream isolates", *International journal of antimicrobial agents*. 54(1), tr. 1-7.
228. Shakti Rath và các cộng sự. (2014), "Surveillance of ESBL producing multidrug resistant *Escherichia coli* in a teaching hospital in India", *Asian Pacific journal of tropical disease*. 4(2), tr. 140-149.
229. David S Reeves và các cộng sự. (1999), "Self-medication of antibacterials without prescription (also called 'over-the-counter' use) A report of a Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 44(2), tr. 163-177.
230. WHO Antibiotic Resistance (2015), "Multi-country public awareness survey", *World Health Organization: Geneva, Switzerland*, tr. 59.
231. Mohammad Sadegh Rezai và các cộng sự. (2015), "Characterization of multidrug resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among uropathogens of pediatrics in North of Iran", *BioMed research international*. 2015.
232. Leah Roberts và các cộng sự. (2020), "A genomic epidemiology study of multidrug-resistant *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in two intensive care units in Hanoi, Vietnam", *medRxiv*.
233. Rebecca R Roberts và các cộng sự. (2009), Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implications for antibiotic stewardship. *Clin Infect Dis*49: 1175–1184, chủ biên.
234. Victor Daniel Rosenthal, Sandra Guzman và Pablo Wenceslao Orellano (2003), "Nosocomial infections in medical-surgical intensive care units in Argentina: attributable mortality and length of stay", *American journal of infection control*. 31(5), tr. 291-295.
235. Helio S. Sader và các cộng sự. (2001), "Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program", *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 5(4), tr. 200-214.

236. R. Ben Sallem và các cộng sự. (2012), "Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia", *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 31(7), tr. 1511-1516.
237. Florian Salm và các cộng sự. (2018), "Antibiotic use, knowledge and health literacy among the general population in Berlin, Germany and its surrounding rural areas", *PLoS One*. 13(2), tr. e0193336.
238. Samba Adama Sangare và các cộng sự. (2017), "Very high prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in bacteremic patients hospitalized in teaching hospitals in Bamako, Mali", *PloS one*. 12(2), tr. e0172652.
239. Rema Devi Saradamma, Nick Higginbotham và Mark Nichter (2000), "Social factors influencing the acquisition of antibiotics without prescription in Kerala State, south India", *Social science & medicine*. 50(6), tr. 891-903.
240. Tadahiro Sasaki và các cộng sự. (2010), "High prevalence of CTX-M β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in stool specimens obtained from healthy individuals in Thailand", *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 65(4), tr. 666-668.
241. Didier Schoevaerdt và các cộng sự. (2012), "Multidrug-resistant bacteria colonization amongst patients newly admitted to a geriatric unit: a prospective cohort study", *Journal of Infection*. 65(2), tr. 109-118.
242. Ramalingam Sekar và các cộng sự. (2016), "Carbapenem resistance in a rural part of southern India: *Escherichia coli* versus *Klebsiella* spp", *The Indian journal of medical research*. 144(5), tr. 781.
243. Sima Sadat Seyedjavadi, Mehdi Goudarzi và Fattaneh Sabzehali (2016), "Relation between blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genes and acute urinary tract infections", *Journal of Acute Disease*. 5(1), tr. 71-76.
244. P Ravi Shankar và R Balasubramaniam (2014), "Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014", *Australasian Medical Journal (Online)*. 7(5), tr. 237.
245. Meeta Sharma, Sati Pathak và Preeti Srivastava (2013), "Prevalence and antibiogram of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) producing Gram negative bacilli and further molecular characterization of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp", *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 7(10), tr. 2173.
246. Rania Y Shash và các cộng sự. (2019), "Molecular characterization of extended-Spectrum β -lactamase Enterobacteriaceae isolated from Egyptian patients with

community-and hospital-acquired urinary tract infection", *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 100(3), tr. 522-528.

247. Bong Suk Shim và các cộng sự. (2011), "Antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infections: results from the Korean Antimicrobial Resistance Monitoring System", *Journal of infection and chemotherapy*. 17(3), tr. 440-446.

248. Shewki Moga Siraj, Solomon Ali và Beyene Wondafrash (2014), "Extended-spectrum-lactamase production and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* among inpatients and outpatients of Jimma University specialized hospital, south-west, Ethiopia", *African Journal of Microbiology Research*. 8(43), tr. 3687-3694.

249. Kanjanachaya Sirijoti và các cộng sự. (2014), "Assessment of knowledge attitudes and practices regarding antibiotic use in Trang province, Thailand", *Journal of health research*. 28(5), tr. 299-307.

250. D Sirot và các cộng sự. (1987), "Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 20(3), tr. 323-334.

251. H. E. Smith và S. Yun (2017), "Evaluating alignment and variant-calling software for mutation identification in *C. elegans* by whole-genome sequencing", *PLoS One*. 12(3), tr. e0174446.

252. Tara C Smith và các cộng sự. (2009), "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern US swine and swine workers", *Plos one*. 4(1), tr. e4258.

253. Jae-Hoon Song và các cộng sự. (2011), "Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study", *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 66(5), tr. 1061-1069.

254. Arne Søråas và các cộng sự. (2013), "Risk factors for community-acquired urinary tract infections caused by ESBL-producing enterobacteriaceae—a case–control study in a low prevalence country", *PloS one*. 8(7), tr. e69581.

255. Kangde Sun và các cộng sự. (2015), "Clonal dissemination of multilocus sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase–Producing *K. pneumoniae* in a Chinese teaching hospital", *Apmis*. 123(2), tr. 123-127.

256. Waleed M Sweileh (2021), "Global research publications on irrational use of antimicrobials: call for more research to contain antimicrobial resistance", *Globalization and Health*. 17(1), tr. 1-12.

257. Tatsuya Tada và các cộng sự. (2017), "Dissemination of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of Carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA Methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam", *BMC infectious diseases*. 17(1), tr. 1-7.
258. EJ Threlfall và các cộng sự. (1986), "Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella typhimurium* phage type 204c isolated in Britain", *Epidemiology & Infection*. 97(3), tr. 419-426.
259. Duong Bich Thuy và các cộng sự. (2018), "Hospital-acquired colonization and infections in a Vietnamese intensive care unit", *PLoS One*. 13(9), tr. e0203600.
260. Neusa F Torres và các cộng sự. (2021), "The use of non-prescribed antibiotics; prevalence estimates in low-and-middle-income countries. A systematic review and meta-analysis", *Archives of Public Health*. 79(1), tr. 1-15.
261. Duong Thi Quy Truong và các cộng sự. (2021), "Genetic Comparison of ESBL-Producing *Escherichia coli* from Workers and Pigs at Vietnamese Pig Farms", *Antibiotics*. 10(10), tr. 1165.
262. I. L. Tseng và các cộng sự. (2015), "Emergence of Carbapenemase Producing *Klebsiella Pneumonia* and Spread of KPC-2 and KPC-17 in Taiwan: A Nationwide Study from 2011 to 2013", *PLoS One*. 10(9), tr. e0138471.
263. Tshokey Tshokey và các cộng sự. (2017), "Assessing the knowledge, attitudes, and practices on antibiotics among the general public attending the outpatient pharmacy units of hospitals in Bhutan: a cross-sectional survey", *Asia Pacific Journal of Public Health*. 29(7), tr. 580-588.
264. E. Tzelepi và các cộng sự. (2003), "Extended-spectrum β -lactamase types in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in two Greek hospitals", *International journal of antimicrobial agents*. 21(3), tr. 285-288.
265. UV Ukah và các cộng sự. (2018), "Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Escherichia coli* and development of community-acquired urinary tract infections", *Epidemiology & Infection*. 146(1), tr. 46-57.
266. Rachel Urwin và Martin CJ Maiden (2003), "Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology", *Trends in microbiology*. 11(10), tr. 479-487.
267. Martina Vallin và các cộng sự. (2016), "Knowledge and attitudes towards antibiotic use and resistance-a latent class analysis of a Swedish population-based sample", *PloS one*. 11(4), tr. e0152160.

268. Thomas P Van Boeckel và các cộng sự. (2017), "Reducing antimicrobial use in food animals", *Science*. 357(6358), tr. 1350-1352.
269. Nienke Van De Sande-Bruinsma và các cộng sự. (2008), "Antimicrobial drug use and resistance in Europe", *Emerging infectious diseases*. 14(11), tr. 1722.
270. Anthony E van den Bogaard và Ellen E Stobberingh (2000), "Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans", *International journal of antimicrobial agents*. 14(4), tr. 327-335.
271. David Van Duin và David L Paterson (2016), "Multidrug-resistant bacteria in the community: trends and lessons learned", *Infectious disease clinics*. 30(2), tr. 377-390.
272. Ha Thi Thu Van và các cộng sự. (2021), "Whole Genome Analysis of the Extensively Drug Resistant Clinical *Klebsiella Pneumonia* Isolates from the Military Hospital in Vietnam".
273. Inge Van Loo và các cộng sự. (2007), "Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans", *Emerging infectious diseases*. 13(12), tr. 1834.
274. Konstantinos Z Vardakas và các cộng sự. (2013), "Predictors of mortality in patients with infections due to multi-drug resistant Gram negative bacteria: the study, the patient, the bug or the drug?", *Journal of Infection*. 66(5), tr. 401-414.
275. Nathalie Vernaz và các cộng sự. (2011), "Modelling the impact of antibiotic use on antibiotic-resistant *Escherichia coli* using population-based data from a large hospital and its surrounding community", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66(4), tr. 928-935.
276. Maria Virginia Villegas và các cộng sự. (2011), "Increasing prevalence of extended-spectrum-betalactamase among Gram-negative bacilli in Latin America: 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART)", *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 15(1), tr. 34-39.
277. Bích Vu Thi Ngoc và các cộng sự. (2022), "Characterization of Genetic Elements Carrying *mcr-1* Gene in *Escherichia coli* from the Community and Hospital Settings in Vietnam", *Microbiology spectrum*. 10(1), tr. e01356-21.
278. Tien Viet Dung Vu và các cộng sự. (2021), "Antimicrobial susceptibility testing results from 13 hospitals in Viet Nam: VINARES 2016–2017", *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 10(1), tr. 1-11.

279. Sarah L Warnes, Callum J Highmore và C William Keevil (2012), "Horizontal transfer of antibiotic resistance genes on abiotic touch surfaces: implications for public health", *MBio*. 3(6).
280. PA Wayne, "CLSI; 2010", *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100-S20*.
281. David J Weber và các cộng sự. (2010), "Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species", *American journal of infection control*. 38(5), tr. S25-S33.
282. Guido Werner và các cộng sự. (2003), "Intra-hospital dissemination of quinupristin/dalfopristin-and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric ward of a German hospital", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52(1), tr. 113-115.
283. WHO (2015), *Global action plan on antimicrobial resistance.*, truy cập ngày, tại trang web <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>.
284. WHO (2021), *Antimicrobial resistance*, truy cập ngày, tại trang web <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
285. WHO (2022), *Vietnam/Health topic/Antimicrobial resistance* truy cập ngày-2022, tại trang web <https://www.who.int/vietnam/health-topics/antimicrobial-resistance>.
286. WHO. (2007), *he world health report 2007. A safer future: global public health security in the 21st century.*, truy cập ngày, tại trang web Available <http://www.who.int/whr/2007/en/>. .
287. Aris Widayati và các cộng sự. (2011), "Self medication with antibiotics in Yogyakarta City Indonesia: a cross sectional population-based survey", *BMC research notes*. 4(1), tr. 1-8.
288. Gerard D Wright (2007), "The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity", *Nature Reviews Microbiology*. 5(3), tr. 175-186.
289. Liangfei Xu, Xiaoxi Sun và Xiaoling Ma (2017), "Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*", *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 16(1), tr. 1-12.

290. Merzouk Yahiaoui và các cộng sự. (2015), "Antibiotic resistance, virulence, and genetic background of community-acquired uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria", *Microbial Drug Resistance*. 21(5), tr. 516-526.
291. J. Yang và các cộng sự. (2013), "A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395", *Clin Microbiol Infect*. 19(11), tr. E509-15.
292. Qiwen Yang và các cộng sự. (2013), "A 10 year surveillance for antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in community-and hospital-associated intra-abdominal infections in China", *Journal of medical microbiology*. 62(9), tr. 1343-1349.
293. Hesna Yigit và các cộng sự. (2001), "Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 45(4), tr. 1151-1161.
294. Dongeun Yong và các cộng sự. (2009), "Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 53(12), tr. 5046-5054.
295. JHS You và các cộng sự. (2008), "Public knowledge, attitudes and behavior on antibiotic use: a telephone survey in Hong Kong", *Infection*. 36(2), tr. 153-157.
296. A. Zagorianou và các cộng sự. (2012), "Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010", *Euro Surveill*. 17(7).
297. Veronica Zanichelli và các cộng sự. (2019), "Antimicrobial resistance trends in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* urinary isolates from Switzerland: retrospective analysis of data from a national surveillance network over an 8-year period (2009-2016)", *Swiss medical weekly*. 149, tr. w20110.
298. G Zarfel và các cộng sự. (2013), "Comparison of extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection", *Environmental pollution*. 173, tr. 192-199.
299. Ling Zeng và các cộng sự. (2020), "Prevalence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection in Southern China: clinical characteristics, antimicrobial resistance, virulence, and geographic distribution", *Microbial Drug Resistance*. 26(5), tr. 483-491.

300. Jing Zhang và các cộng sự. (2016), "High prevalence of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* causing community-onset infections in China", *Frontiers in microbiology*. 7, tr. 1830.
301. Xue-Fei Zhang và các cộng sự. (2016), "Possible transmission of mcr-1–harboring *Escherichia coli* between companion animals and human", *Emerging infectious diseases*. 22(9), tr. 1679.