

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án, tôi luôn nhận được sự giúp đỡ tận tình của nhiều Cơ quan, tập thể và cá nhân. Nhân dịp này, tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương, Trung tâm Đào tạo và Quản lý Khoa học, Bộ môn Vi sinh đã luôn tạo điều kiện thuận lợi giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành bản luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Đảng ủy, Ban Giám hiệu, Trung tâm Dịch vụ Khoa học Kỹ thuật Y Dược - Trường Đại học Y Dược Thái Bình, Khoa vi khuẩn - Viện vệ sinh Dịch tễ Trung Ương, Viện Y tế công cộng phủ Osaka-Nhật Bản đã cho phép tôi được sử dụng các trang thiết bị máy móc, hỗ trợ kỹ thuật và tạo điều kiện, môi trường nghiên cứu tốt nhất cho tôi thực hiện nghiên cứu, hoàn thành luận án.

Đặc biệt, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc đến PGS.TS Hoàng Thị Thu Hà và PGS.TS. Phạm Ngọc Khái, những người thầy đã tận tình hướng dẫn và chia sẻ cho tôi những kiến thức, phương pháp nghiên cứu khoa học vô cùng quý giá, luôn động viên, quan tâm và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án .

Tôi vô cùng biết ơn các nhà khoa học trong các hội đồng chấm thi và tham gia phản biện đã cho tôi những ý kiến quý giá để hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn những người dân xã Nguyên Xá đã nhiệt tình tham gia nghiên cứu, giúp tôi hoàn thành đề tài luận án.

Tôi luôn biết ơn các bạn bè, đồng nghiệp đã đóng góp công sức, động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Sau nữa, tôi vô cùng biết ơn những người thân trong gia đình đã luôn quan tâm, động viên, khích lệ và là chỗ dựa vững chắc để tôi vượt qua mọi khó khăn trong suốt quá trình học và nghiên cứu để hoàn thành luận án.

Tác giả luận án

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình khoa học của riêng tôi. Các số liệu và kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa có ai từng công bố trong bất cứ công trình nghiên cứu nào.

Hà Nội, ngày tháng năm 2020

Nghiên cứu sinh

Khổng Thị Điệp

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	i
LỜI CAM ĐOAN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG	ix
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	xii
ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Tình hình nhiễm và kháng kháng sinh của <i>E. coli</i> sinh β -lactamase phổ mở rộng ở người.....	3
1.1.1. Tình hình nhiễm <i>E. coli</i> sinh β -lactamase phổ mở rộng ở người	3
1.1.2. Tình hình kháng kháng sinh của <i>E. coli</i> sinh ESBL trên người	9
1.2. Một số đặc điểm và phương pháp nghiên cứu <i>E. coli</i> sinh ESBL	17
1.2.1. Đặc điểm sinh học	17
1.2.2. Đặc điểm và sự lưu hành các ESBL và các gen mã hóa sinh ESBL	18
1.2.3. Đặc điểm phân nhóm phát sinh loài (phylogenetic group).....	23
1.2.4. Đặc điểm gây bệnh của vi khuẩn <i>E. coli</i> trên người	24
1.2.5. Khả năng lan truyền vi khuẩn <i>E. coli</i> sinh ESBL	27
1.2.6. Các phương pháp nghiên cứu <i>E. coli</i> sinh ESBL.....	28
Chương 2: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	37
2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu	37
2.1.1. Địa điểm nghiên cứu	37
2.1.2. Thời gian nghiên cứu	39
2.1.3. Đối tượng nghiên cứu	39
2.2. Phương pháp nghiên cứu	39
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	39
2.2.2. Phương pháp chọn mẫu và tính cỡ mẫu	39
2.3. Các biến số và chỉ số nghiên cứu	41

2.4. Vật liệu nghiên cứu.....	42
2.5. Các kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu	45
2.5.1. Kỹ thuật lấy mẫu phân	47
2.5.2. Kỹ thuật nuôi cấy, phân lập <i>E. coli</i> từ mẫu phân	48
2.5.3. Kỹ thuật định danh vi khuẩn <i>E. coli</i>	49
2.5.4. Kỹ thuật xác định kiểu hình ESBL của các chủng <i>E. coli</i>	50
2.5.5. Kỹ thuật xác định đặc điểm kháng kháng sinh của <i>E. coli</i> sinh ESBL	52
2.5.6. Kỹ thuật xác định gen mã hóa sinh ESBL của <i>E. coli</i> sinh ESBL	54
2.5.7. Kỹ thuật xác định gen <i>mcr-1</i> kháng colistin của <i>E. coli</i> sinh ESBL	55
2.5.8. Kỹ thuật xác định đặc điểm phân nhóm phát sinh loài của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	56
2.5.9. Kỹ thuật xác định gen độc lực của vi khuẩn <i>E. coli</i> sinh ESBL	58
2.5.10. Phân tích mối liên hệ kiểu gen bằng kỹ thuật PFGE	59
2.5.11. Kỹ thuật xác định các loại plasmid của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	61
2.5.12. Xác định vị trí các gen mã hóa sinh ESBL bằng phương pháp Southern Blot.....	63
2.5.13. Đánh giá khả năng truyền các gen mã hóa sinh ESBL của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL trong mô hình phòng thí nghiệm bằng phương pháp tiếp hợp.....	66
2.6. Phương pháp xử lý số liệu	68
2.7. Biện pháp không chế sai số	68
2.8. Đạo đức nghiên cứu.....	69
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	70
3.1. Sự lưu hành của vi khuẩn <i>E. coli</i> sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh tại cộng đồng nông thôn tỉnh Thái Bình.....	70
3.1.1. Đặc điểm của đối tượng xét nghiệm.....	70
3.1.2. Sự lưu hành của vi khuẩn <i>E. coli</i> sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh.....	72
3.2. Đặc điểm sinh học của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL.....	76
3.2.1. Đặc điểm sinh vật, hóa học của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	76
3.2.2. Đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	77

3.2.3. Đặc điểm các gen mã hóa sinh ESBL ở các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	79
3.2.4. Đặc điểm phân nhóm phát sinh loài của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	84
3.2.5. Đặc điểm các gen độc lực trong các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	86
3.2.6. Môi liên hệ kiểu gen giữa các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	88
3.2.7. Phân tích đặc điểm plasmid của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	91
Chương 4: BÀN LUẬN	100
4.1. Sự lưu hành của vi khuẩn <i>E. coli</i> sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh tại cộng đồng nông thôn tỉnh Thái Bình.....	100
4.1.1. Đặc điểm của đối tượng xét nghiệm.....	100
4.1.2. Sự lưu hành của <i>E. coli</i> sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh...	101
4.2. Đặc điểm sinh học của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL.....	104
4.2.1. Đặc điểm sinh vật, hóa học của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	104
4.2.2. Đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	104
4.2.3. Đặc điểm các gen mã hóa sinh ESBL ở các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	108
4.2.4. Đặc điểm phân nhóm phát sinh loài của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL ...	111
4.2.5. Đặc điểm các gen độc lực của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	112
4.2.6. Môi liên hệ kiểu gen giữa các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	114
4.2.7. Phân tích đặc điểm plasmid của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	117
4.3. Hạn chế và hướng nghiên cứu tiếp theo.....	123
KẾT LUẬN	124
KIẾN NGHỊ.....	126
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI LUẬN ÁN	127
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

DNA	Acid Deoxyribo nucleic
AMP	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
ASTS	Antibiotic Susceptibility Testing Surveillance (Chương trình quốc gia giám sát độ nhạy cảm với kháng sinh)
CAZ	Ceftazidime
CAZ-C	Ceftazidime/acid clavulanic
CFU	Clon forming unit
CHL	Chloramphenicol
CIP	Ciprofloxacin
CLA	Acid clavulanic
CLIG	Cellobiose - lactose- indole - β - d-glucuronidase agar
CLSI	Clinical and Laboratories Standards Institute (Viện tiêu chuẩn lâm sàng và phòng thí nghiệm)
CTX	Cefotaxim
CTX-C	Cefotaxim/acid clavulanic
CXM	Cefuroxim
DAEC	Diffusely adherent <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> gây bám dính phân tán
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	Enteraggregative <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> gây bám dính kết tập ruột)
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control

(Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh, Châu Âu)

EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EHEC	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> gây xuất huyết đường ruột)
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> xâm nhập đường ruột)
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> gây bệnh đường ruột)
ETEC	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> sinh độc tố ruột)
ESBL	Extended -Spectrum Beta-Lactamase
FOF	Fosfomycin
FOX	Cefoxitin
GEN	Gentamycin
H ₂ S	Hydro Sulfua
KAN	Kanamycin
LB	Luria Betari
LCR	Ligase Chain Reaction
LIM	Lysine-Indole-Motility
LT	Heat-Labile-Toxin
MEM	Meropenem
MIC	Minimum Inhibitor Concentrate (nồng độ ức chế tối thiểu)
MH	Muller Hilton
MLST	Multi locus sequence typing (giải trình tự gen nhiều locus)
NAL	Nalidixic acid
PCR	Polymerase chain reaction (phản ứng trùng hợp chuỗi)

PCR-SSCP	PCR single-strDNA conformational polymorphism
PFGE	Pulse-field gel electrophoresis (điện di xung trường)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (đa hình chiều dài các đoạn cắt bởi enzyme giới hạn)
SMART	Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends program (Chương trình giám sát xu hướng kháng kháng sinh)
STR	Streptomycin
SXT	Trimethoprim/sulfamethoxazole
ST	Shiga toxin
STEC	Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i>
TET	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA
TSA	Trypticase Soy Agar
TSI	Triple sugar/ iron agar
WHO	World Health Organization (Tổ chức Y tế thế giới)

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Tỷ lệ <i>E. coli</i> sinh ESBL ở một số bệnh viện (ASTS).....	7
Bảng 1.2. Các kháng sinh để đánh giá kháng đa thuốc ở Enterobacteriaceae [85].....	11
Bảng 1.3. Ưu, nhược điểm của các phương pháp phát hiện <i>E. coli</i> sinh ESBL.....	33
Bảng 2.1. Tên các kỹ thuật thực hiện trong nghiên cứu.....	46
Bảng 2.2. Tiêu chuẩn chẩn đoán <i>E. coli</i> [70]	50
Bảng 2.3. Đường kính vùng ức chế đối với vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae của một số loại kháng sinh [43].....	53
Bảng 2.4. Trình tự môi cho phản ứng PCR xác định các gen mã hóa sinh ESBL	54
Bảng 2.5. Trình tự môi cho phản ứng Realtime xác định gen <i>mcr-1</i>	55
Bảng 2.6. Trình tự môi cho phản ứng PCR đa môi xác định nhóm phát sinh loài	57
Bảng 2.7. Phân nhóm phát sinh loài dựa vào các gen <i>chuA</i> , <i>yjaA</i> , và <i>TspE4C2</i>	57
Bảng 2.8. Trình tự môi cho phản ứng PCR xác định các gen độc lực.....	58
Bảng 2.9. Trình tự các cặp môi cho phản ứng PCR xác định các plasmid	62
Bảng 3.1. Đặc điểm chung của đối tượng xét nghiệm	70
Bảng 3.2. Đặc điểm của đối tượng xét nghiệm theo nhóm tuổi	70
Bảng 3.3. Đặc điểm hộ gia đình của các đối tượng xét nghiệm	71
Bảng 3.4. Đặc điểm đối tượng xét nghiệm theo trình độ học vấn	71
Bảng 3.5. Đặc điểm đối tượng xét nghiệm theo nghề nghiệp.....	72
Bảng 3.6. Kết quả cấy mẫu phân người trên MacConkey có CTX 1µg/ml	72
Bảng 3.7. Tỷ lệ mang <i>E. coli</i> sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh	73
Bảng 3.8. Tỷ lệ mang <i>E. coli</i> sinh ESBL theo nhóm tuổi.....	73
Bảng 3.9. Tỷ lệ mang <i>E. coli</i> sinh ESBL theo giới tính.....	74
Bảng 3.10. Số người mang <i>E. coli</i> sinh ESBL trong các hộ gia đình.....	74
Bảng 3.11. Tỷ lệ mang <i>E. coli</i> sinh ESBL theo các hộ gia đình.....	75
Bảng 3.12. Tỷ lệ mang <i>E. coli</i> sinh ESBL theo trình độ học vấn.....	75
Bảng 3.13. Tỷ lệ mang <i>E. coli</i> sinh ESBL theo nghề nghiệp	76
Bảng 3.14. Một số tính chất sinh vật, hóa học của <i>E. coli</i> sinh ESBL	76

Bảng 3.15. Tỷ lệ kháng các loại kháng sinh của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	77
Bảng 3.16. Mức độ kháng đa thuốc của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	78
Bảng 3.17. Tỷ lệ mang các kiểu gen mã hóa sinh ESBL nhóm CTX của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	79
Bảng 3.18. Tỷ lệ mang các kiểu gen mã hóa sinh ESBL nhóm TEM, SHV của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	79
Bảng 3.19. Tỷ lệ xuất hiện các kiểu gen mã hóa sinh ESBL của <i>E. coli</i> sinh ESBL..	80
Bảng 3.20. Tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL.....	81
mang kiểu gen <i>blaCTX-M-1</i> và <i>blaCTX-M-9</i>	81
Bảng 3.21. Phân bố tỷ lệ kháng đa thuốc theo các kiểu gen mã hóa ESBL.....	82
Bảng 3.22. Tỷ lệ kháng kháng sinh theo nhóm phát sinh loài.....	85
Bảng 3.23. Phân bố mức độ kháng đa thuốc theo nhóm phát sinh loài.....	86
Bảng 3.24. Phân bố gen độc lực ở các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	86
Bảng 3.25. Tỷ lệ kháng đa thuốc của các chủng mang gen độc lực	87
Bảng 3.26. Tỷ lệ mang gen độc lực của các nhóm phát sinh loài.....	87
Bảng 3.27. Tỷ lệ các loại plasmid trên các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	92
Bảng 3.28. Tỷ lệ xuất hiện các loại plasmid theo kiểu gen mã hóa sinh ESBL ở các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	93
Bảng 3.29. Phân bố số lượng plasmid theo kiểu gen mã hóa sinh ESBL	94
Bảng 3.30. Kết quả lai Southern Blot	95
Bảng 3.31. Tỷ lệ truyền plasmid mang gen <i>blaCTX-M-9</i> , <i>blaCTX-M-1</i> , <i>blaTEM</i> sang <i>E. coli</i> J53	99
Bảng 3.32. Số lượng gen có thể truyền trên các chủng mang đồng thời 2 gen mã hóa sinh ESBL	99

DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 1.1. Tỷ lệ ESBL ở <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> và <i>P. mirabilis</i> trong nhiễm khuẩn ổ bụng theo các vùng từ SMART từ 2002 – 2011	4
Biểu đồ 1.2. Tỷ lệ ESBL ở <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> và <i>P. mirabilis</i> trong nhiễm trùng tiết niệu theo các vùng từ SMART từ 2002 - 2011	4
Biểu đồ 1.3. Tỷ lệ nhiễm các vi khuẩn sinh ESBL ở các nước khu vực châu Á-Thái Bình Dương	5
Biểu đồ 3.1. Số lượng kháng sinh bị kháng ở các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	78
Biểu đồ 3.2. Số lượng gen mã hóa sinh ESBL của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	80
Biểu đồ 3.3. Tỷ lệ kháng đa thuốc theo số lượng gen mã hóa sinh ESBL	82
Biểu đồ 3.4. Tỷ lệ các chủng <i>E. coli</i> mang gen <i>mcr-1</i>	83
Biểu đồ 3.5. Biểu đồ minh họa kết quả realtime-PCR xác định gen <i>mcr-1</i>	83
Biểu đồ 3.6. Tỷ lệ các nhóm phát sinh loài của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	84
Biểu đồ 3.7. Số lượng các plasmid trong 1 chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	91
Biểu đồ 3.8. Tỷ lệ truyền plasmid mang gen mã hóa sinh ESBL ở các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL sang <i>E. coli</i> J53	98

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Tỷ lệ (%) các chủng <i>E. coli</i> kháng cephalosporins thế hệ 3 ở các nước châu Âu, 2012	14
Hình 2.1. Bản đồ hành chính tỉnh Thái Bình	38
Hình 2.2. Sơ đồ tóm tắt phương pháp thu thập thông tin nghiên cứu.....	47
Hình 2.3. Cách cấy mẫu phân trên môi trường MacConkey	48
Hình 2.4. Cách cấy khuẩn lạc trên TSI, CLIG, LIM	49
Hình 2.5. Hình ảnh minh họa kỹ thuật Southern Blot.....	66
Hình 3.1. Hình ảnh điện di các gen nhóm <i>blaCTX</i> , <i>blaTEM</i> và <i>blaSHV</i>	81
Hình 3.2. Hình ảnh điện di các gen xác định nhóm phát sinh loài	84
Hình 3.3. Cây phả hệ thể hiện mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL phân lập được	90
Hình 3.4. Hình ảnh đại diện PFGE về mối liên hệ giữa các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL phân lập được trong nghiên cứu.....	91
Hình 3.5. Kết quả đại diện lai Southern Blot	96
Hình 3.6. Kết quả đại diện truyền plasmid mang các gen mã hóa sinh ESBL từ chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> sinh ESBL sang chủng <i>E. coli</i> J53.	97

ĐẶT VẤN ĐỀ

Thuốc kháng sinh được coi là một giải pháp cho loài người trong phòng và điều trị bệnh do nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, trong những năm gần đây vi khuẩn kháng lại thuốc kháng sinh ngày càng nghiêm trọng và sự lan truyền các vi khuẩn kháng kháng sinh đang trở thành mối đe dọa lớn cho sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới.

Có nhiều cơ chế kháng kháng sinh, trong đó cơ chế ức chế bằng enzyme β -lactamase phổ mở rộng, hay còn được gọi là ESBL (Extended - Spectrum Beta -Lactamase) là cơ chế thường gặp. ESBL là các enzyme do vi khuẩn sinh ra, chúng có khả năng làm bất hoạt các thuốc nhóm β -lactam bằng cách phá hủy nối amide của vòng β -lactam vì vậy các vi khuẩn có enzyme này kháng lại các kháng sinh nhóm β -lactam rất hiệu quả. ESBL thường được tìm thấy trong các nhóm *Enterobacteriaceae*, thường gặp ở *Escherichia coli* (*E. coli*) [32, 101].

E. coli là vi khuẩn sống cộng sinh trong đường tiêu hóa, nhưng nó cũng là một trong những tác nhân gây bệnh khá phổ biến ở người. Trên nhiều chủng *E. coli* sinh ESBL, các plasmid không chỉ mang gen mã hóa sinh ESBL mà còn kèm các gen kháng kháng sinh khác, vì vậy các vi khuẩn này có thể kháng đồng thời nhiều loại kháng sinh [32]. Mặt khác, các chủng *E. coli* mang gen mã hóa sinh ESBL còn có khả năng truyền các gen kháng kháng sinh cho các vi khuẩn khác trong cùng loài hoặc cho các loài vi khuẩn gây bệnh khác như: *Salmonella*, *Shigella*... làm gia tăng tình trạng kháng kháng sinh trong cộng đồng và gây ra những khó khăn trong điều trị lâm sàng [32, 101].

Trên thế giới, tỷ lệ nhiễm *E. coli* sinh ESBL chiếm tỷ lệ từ 5% đến 62%. Tỷ lệ này cao ở khu vực châu Á, đặc biệt là các nước khu vực Nam Á và Trung Quốc (trên 50%) ở cả bệnh viện và cộng đồng [61, 92].

Tại Việt Nam, tỉ lệ nhiễm *E. coli* sinh ESBL là tương đối cao: 18% đến 57,3 % trong bệnh viện [61, 92]. Hầu hết các nghiên cứu có liên quan đến *E. coli* sinh ESBL chủ yếu là trên các bệnh phẩm của bệnh nhân tại bệnh viện, rất ít các nghiên cứu được thực hiện trên người khỏe mạnh tại cộng đồng. Đặc biệt những thông tin về đặc điểm vi sinh y học của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL tại cộng đồng hầu như chưa được thông báo.

Vì vậy cần thiết có những nghiên cứu trên người khỏe mạnh tại cộng đồng nhằm đánh giá thực trạng nhiễm, đặc điểm vi sinh học của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL tại cộng đồng, góp phần đưa ra bức tranh tổng thể về dịch tễ học của vi khuẩn *E. coli* tại cộng đồng, cung cấp cơ sở khoa học cho việc thiết lập hệ thống giám sát, phòng ngừa sự lây nhiễm và lan truyền vi khuẩn kháng kháng sinh tại cộng đồng. Do đó chúng tôi thực hiện đề tài “**Xác định một số đặc điểm vi sinh của *Escherichia coli* sinh beta lactamase phổ mở rộng ở người khỏe mạnh tại cộng đồng huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình, năm 2016**” với các mục tiêu sau:

1. Xác định sự lưu hành của *Escherichia coli* sinh beta-lactamase phổ mở rộng ở người khỏe mạnh tại cộng đồng, huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình, năm 2016.

2. Xác định một số đặc điểm sinh học của các chủng *Escherichia coli* sinh beta-lactamase phổ mở rộng phân lập được từ người khỏe mạnh tại cộng đồng.

Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tình hình nhiễm và kháng kháng sinh của *E. coli* sinh β -lactamase phổ mở rộng ở người

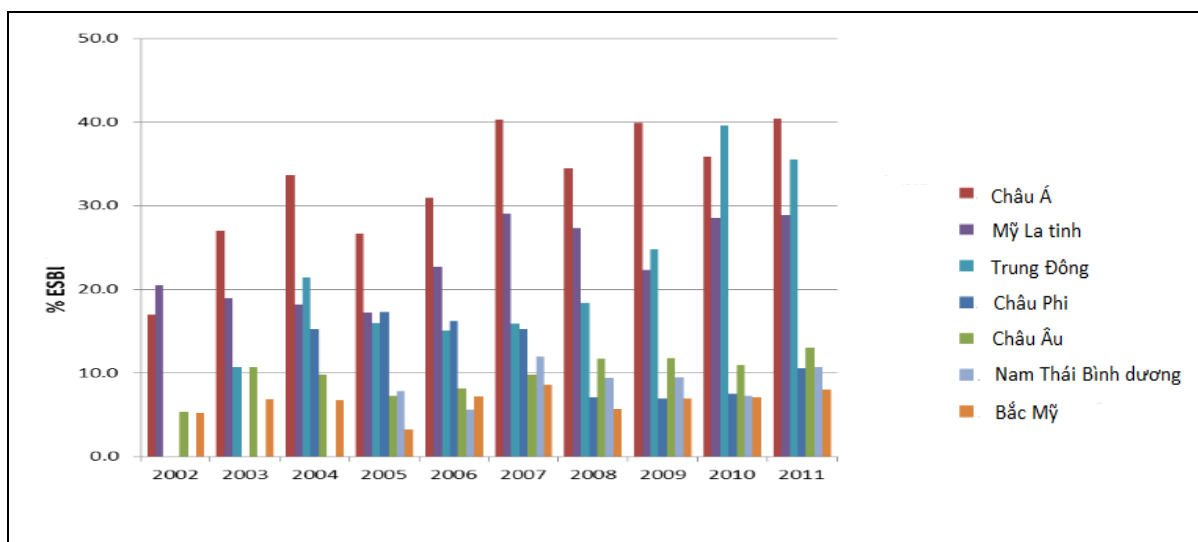
1.1.1. Tình hình nhiễm *E. coli* sinh β -lactamase phổ mở rộng ở người

1.1.1.1. Trên thế giới

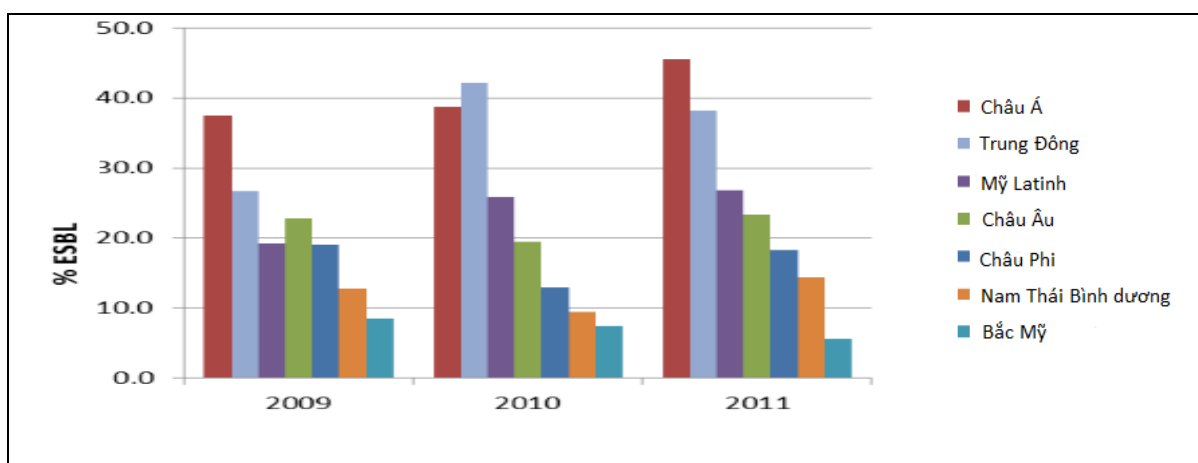
a. Trong bệnh viện

Vi khuẩn sinh ESBL được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1983 tại Tây Âu. Sau đó không lâu, ESBL được phát hiện ở Mỹ và Châu Á, hiện nay nó đã lan ra toàn cầu và là vấn đề thu hút sự quan tâm của nhiều nhà khoa học trên thế giới. ESBL xuất hiện ở nhiều vi khuẩn trong đó chủ yếu là ở nhóm trực khuẩn gram âm, thường gặp ở *E. coli* [32, 52, 101].

Theo chương trình giám sát xu hướng kháng kháng sinh trên toàn thế giới (SMART) giai đoạn 2002 – 2011 ở 179 bệnh viện trên thế giới cho thấy: *E. coli* là nguyên nhân hàng đầu gây nhiễm khuẩn ổ bụng (47,8%) và nhiễm khuẩn tiết niệu (44,3%). Trong nhiễm khuẩn ổ bụng, vi khuẩn sinh ESBL cao ở châu Á, Mỹ Latinh và Trung Đông (20% - 40%); châu Âu, Bắc Mỹ, Nam Thái Bình Dương và châu Phi có tỷ lệ thấp hơn (5-15%). Trong nhiễm khuẩn tiết niệu tỷ lệ vi khuẩn sinh ESBL cao nhất ở châu Á và Trung Đông (30% - 50%), tiếp đến là Mỹ Latinh và châu Âu (khoảng 20%), tỷ lệ này thấp nhất ở châu Phi, Nam Thái Bình Dương và Bắc Mỹ (khoảng 10%). Tỷ lệ ESBL ở cả bệnh nhân nhiễm khuẩn ổ bụng và nhiễm khuẩn tiết niệu tăng theo thời gian ở hầu hết các khu vực, đặc biệt là ở châu Á và Trung Đông [92].



Biểu đồ 1.1. Tỷ lệ ESBL ở *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* và *P. mirabilis* trong nhiễm khuẩn ổ bụng theo các vùng từ SMART từ 2002 – 2011 [92].



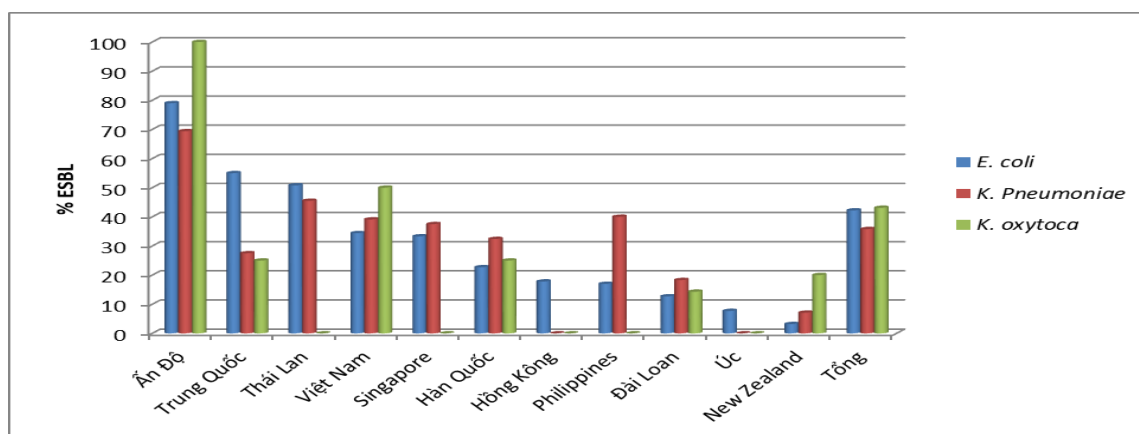
Biểu đồ 1.2. Tỷ lệ ESBL ở *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* và *P. mirabilis* trong nhiễm trùng tiết niệu theo các vùng từ SMART từ 2002 - 2011 [92].

Trong báo cáo giám sát hàng năm của Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa bệnh tật châu Âu (ECDC, 2012) cho thấy tỷ lệ sinh ESBL của các chủng *E. coli* kháng cephalosporin thế hệ ba ở 23 quốc gia thuộc châu Âu rất cao (70,5% đến 100%). Có tới 16 trong 23 quốc gia báo cáo có tỷ lệ sinh ESBL ở các chủng *E. coli* kháng cephalosporin thế hệ ba là trên 85%, thậm chí ở một số nước như Hungary, Lithuania và Rumania tỷ lệ này lên đến 100% [115].

Qua các nghiên cứu giám sát về tình hình vi khuẩn kháng kháng sinh ở

khu vực châu Á - Thái Bình Dương cho thấy, *E. coli* sinh ESBL có xu hướng ngày càng gia tăng.

Nghiên cứu SMART từ năm 2007: Trong tổng số 3004 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 ESBL trung bình là Việt Nam (34,4%), Singapore (33,3%). Các quốc gia có tỉ lệ thấp hơn (3,2 - 22,7%) là Hàn Quốc, Hồng Kông, Philippine, Đài Loan, Úc, New Zealand [61].



Biểu đồ 1.3. Tỷ lệ nhiễm các vi khuẩn sinh ESBL ở các nước khu vực châu Á-Thái Bình Dương [61].

Nghiên cứu SMART trên 17.350 chủng vi khuẩn Gram âm phân lập từ bệnh nhân nhiễm khuẩn ổ bụng ở 54 bệnh viện thuộc 13 nước trong vùng châu Á - Thái Bình Dương giai đoạn 2010 - 2013 cho thấy: *E. coli* là tác nhân chủ yếu (46,1%). Tỷ lệ sinh ESBL ở *E. coli* là 38,2%. Trong đó tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL trong các nhiễm khuẩn tại bệnh viện cao nhất ở Ấn Độ (79%), Trung Quốc (55%), Thái Lan (50%) và Việt Nam (34,4%). Ở các nước này tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL trong các nhiễm khuẩn cộng đồng là khoảng 20% [41].

Nhóm nghiên cứu của tác giả Villegas thực hiện trên các chủng vi khuẩn Gram âm được thu thập từ các bệnh nhân nhiễm khuẩn ổ bụng từ 23 trung tâm thuộc 10 nước Mỹ Latinh cho thấy trong *E. coli* là các tác nhân phổ

biến nhất, tỷ lệ sinh ESBL ở *E. coli* là 26.8% [121].

Một nghiên cứu được thực hiện ở Nam Phi giai đoạn 1998-1999 cho thấy tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL là 5,1 % [28].

Nghiên cứu gần đây của tác giả Sangare và cộng sự tại 2 bệnh viện lớn ở Mali cho thấy: tỷ lệ sinh ESBL của các vi khuẩn đường ruột phân lập từ máu bệnh nhân là 62,3 %. Trong đó *E. coli* sinh ESBL chiếm 64,5% [108].

b. Tại cộng đồng

Một số nghiên cứu gần đây cho thấy vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL không chỉ xuất hiện trong bệnh viện mà còn được phát hiện ở cả những người khỏe mạnh tại cộng đồng ở nhiều nơi trên thế giới.

Tại Thụy Sĩ: Theo nghiên cứu của tác giả Geser và cộng sự trên mẫu phân của 586 người khỏe mạnh tại Thụy Sĩ năm 2013 cho thấy có 5,8 % người khỏe mạnh nhiễm *E. coli* sinh ESBL [51].

Tại Pháp: Tác giả Nicolas - Chanoine thông báo tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL ở những người trưởng thành khỏe mạnh tại khu vực Pari tăng lên gấp 10 lần sau 5 năm (0,6% vào năm 2006 và 6% vào năm 2011) [98].

Kết quả nghiên cứu của tác giả Valenza (2014) trên 3344 mẫu phân người khỏe mạnh trong cộng đồng có tiếp xúc gần với bệnh nhân nhiễm khuẩn tiêu hóa tại Đức cho thấy tỷ lệ sinh ESBL là 6,3% trong cộng đồng [119].

Tại Trung Quốc, tác giả Li B (2009) công bố có tới 50,5% mẫu phân của những người khỏe mạnh tham gia nghiên cứu có chứa vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL [78].

Nghiên cứu trên 160 người khỏe mạnh ở vùng nông thôn Thái Lan năm 2008 của tác giả Sasaki 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% [109].

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 ESBL trong đường tiêu hóa tại cộng đồng là 7,3% [29].

1.1.1.2. Tại Việt Nam

a. Trong bệnh viện

Hiện nay *E. coli* sinh ESBL đã lưu hành rộng khắp trên các bệnh viện trong cả nước. Vi khuẩn này là một trong các tác nhân gây các bệnh nhiễm khuẩn trong bệnh viện như nhiễm khuẩn tiết niệu, nhiễm khuẩn tiêu hóa với tỷ lệ kháng kháng sinh cao.

Theo số liệu của chương trình quốc gia giám sát độ nhạy cảm với kháng sinh (Antibiotic Susceptibility Testing Surveillance – ASTS) 2002 - 2006 từ 10 đơn vị thành viên ở Bắc, Trung, Nam, và các dữ liệu từ các bệnh viện nhiều nơi gửi về cho thấy: bệnh viện càng lớn bao nhiêu thì tỷ lệ các vi khuẩn sinh ESBL càng tăng cao và tỷ lệ vi khuẩn sinh ESBL cũng tăng dần theo từng năm. Tỷ lệ ở các bệnh viện theo thời gian được thể hiện ở bảng 1.1 [7].

Bảng 1.1. Tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL ở một số bệnh viện (ASTS)

Bệnh viện	<i>E. coli</i> sinh ESBL
ASTS- Bộ Y tế (2004)	7,7% (n=548)
Bệnh viện Chợ Rẫy	51,6%
Bệnh viện Việt Đức	34,2%
Bệnh viện Bình Định	36,2%
Bệnh viện Việt Tiệp	36,1%
Bệnh viện Bạch Mai (2005)	18,5%
Bệnh viện Bạch Mai (2006)	21,5%
Bệnh viện Bạch Mai (2007)	41,2%
Bệnh viện Bạch Mai (2008)	42,2%

Tác giả Hoàng Thị Phương Dung 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 công bố có 32,2% các chủng vi khuẩn sinh ESBL, trong đó

E. coli chiếm tỷ lệ cao nhất (71,2%) [6].

Nhóm nghiên cứu của các tác giả Hà Vũ Minh Trang (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 bệnh nhân tiêu chảy là 58%, tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL 78%. Tình trạng kháng kháng sinh ở *E. coli* sinh ESBL cao gấp đôi *E. coli* không sinh ESBL [19].

Nghiên cứu của Mai Văn Tuấn (2008) trên 214 trực khuẩn Gram âm được phân lập tại bệnh viện Trung ương Huế cho thấy *E. coli* sinh ESBL 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 ESBL phân lập được nhiều nhất ở mủ (44,61%), nước tiểu 23,07%, máu và đờm (10,77%). Các vi khuẩn sinh ESBL tập trung chủ yếu ở khoa ngoại (49,22%) và khoa hồi sức cấp cứu (23,07%) [23].

Tác giả Nguyễn Thái Sơn nghiên cứu 401 chủng vi khuẩn 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 ESBL. Trong các vi khuẩn Gram âm sinh ESBL, *E. coli* chiếm tỷ lệ cao nhất (32,43%) [18].

Kết quả nghiên cứu của tác giả Nguyễn Đắc Trung 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: Tỷ lệ sinh ESBL ở các chủng nghiên cứu là 37,31%, trong đó *E. coli* có tỷ lệ sinh ESBL cao nhất (39,53 %) [21].

b. Tại cộng đồng

Một số kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy *E. coli* sinh ESBL không chỉ xuất hiện ở các bệnh nhân nội trú trong bệnh viện mà còn xuất hiện ở các bệnh nhân ngoại trú và thậm chí trên cả người khỏe mạnh tại cộng đồng.

Nghiên cứu của Võ Thị Chi Mai và cộng sự (2010) tại bệnh viện Chợ

Rõ ràng cho thấy: *E. coli* sinh ESBL là tác nhân chủ yếu gây nhiễm khuẩn cộng đồng. Nghiên cứu này cũng chỉ ra tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL ở người đến khám nhưng không nhiễm khuẩn về tiêu hóa cao hơn so với ở các bệnh nhân có nhiễm khuẩn trong bệnh viện [13].

Tác giả Lê Kim Ngọc Giao 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 ESBL chiếm cứ đường tiêu hóa, trong đó *E. coli* chiếm đa số với tỷ lệ 82%. Tỷ lệ mang vi khuẩn sinh ESBL ở đường tiêu hóa cao nhất là nhân viên y tế (70,7%), tiếp đến là người nhà nhân viên y tế (69,2 %) và thấp nhất ở sinh viên (47,9%) [8].

Nghiên cứu của tác giả Nguyễn Đỗ Phúc năm 2013 tại Thành phố Hồ Chí Minh cho thấy có tới 63,1% người khỏe mạnh mang vi khuẩn *Enterobacteriaceae* sinh ESBL. Trong đó *E. coli* chiếm ưu thế với 63% [16].

Tại Hà Nội, tác giả Bùi Mai Hương và cộng sự thông báo tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL ở người khỏe mạnh tại huyện Ba Vì là 46,2 % [65].

1.1.2. Tình hình kháng kháng sinh của *E. coli* sinh ESBL trên người

1.1.2.1. Sự kháng kháng sinh

a. Định nghĩa

Kháng sinh ức chế được sự phát triển của vi khuẩn, nhưng nếu trong môi trường có kháng sinh ở nồng độ thường dùng mà vi khuẩn vẫn phát triển được gọi là kháng kháng sinh [1].

b. Phân loại kháng kháng sinh

Kháng kháng sinh được chia làm hai loại: kháng kháng sinh giả và kháng kháng sinh thật

* *Kháng kháng sinh giả*: Kháng kháng sinh giả là hiện tượng vi khuẩn vẫn nhạy cảm với kháng sinh khi làm kháng sinh đồ trong phòng thí nghiệm nhưng điều trị không đáp ứng [1].

*Kháng kháng sinh thật

+ Kháng kháng sinh tự nhiên: Là do cấu trúc di truyền của một số loài vi khuẩn, sự kháng kháng sinh này mang tính bền vững.

+ Kháng kháng sinh thu được: Là sự kháng lại các thuốc kháng sinh trước kia có phổ tác dụng lên vi khuẩn đó. Sự kháng này là do biến cố di truyền mà vi khuẩn từ chỗ không có trở thành có gen kháng kháng sinh.

Các kháng kháng sinh thu được này thường liên quan đến đột biến nhiễm sắc thể của vi khuẩn đó hoặc do nhận được gen kháng kháng sinh qua các hình thức vận chuyển di truyền như: tiếp hợp khi hai vi khuẩn tiếp xúc trực tiếp với nhau, biến nạp khi vi khuẩn bị ly giải và giải phóng ra DNA tự do hoặc tải nạp nhờ phagior hoặc do một thành phần di truyền di động [1, 17].

c. Cơ chế kháng kháng sinh của vi khuẩn

* Cơ chế chung của sự kháng kháng sinh ở vi khuẩn

Vi khuẩn kháng lại kháng sinh bằng rất nhiều cơ chế như: tạo ra enzyme làm biến đổi và phá hủy kháng sinh, thay đổi đích tác động của kháng sinh, ngăn cản khả năng gắn của kháng sinh vào tế bào vi khuẩn và làm thay đổi đường chuyển hóa (tạo ra các isoenzym) [1, 17].

* Cơ chế kháng của họ vi khuẩn đường ruột với nhóm beta-lactam

Beta-lactam là một họ kháng sinh được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay. Kháng sinh này tác động vào quá trình tổng hợp vách tế bào của vi khuẩn dẫn đến tiêu diệt vi khuẩn [1, 22].

Các vi khuẩn đường ruột kháng lại kháng sinh β -lactam bằng cách sinh ra enzyme β -lactamase làm biến đổi và phá hủy kháng sinh nhóm β -lactam. Để chống lại sự tương tác giữa β -lactam và PBP (penicillin binding protein), phức hợp acyl-enzym được hình thành và phá vỡ liên kết C-N trong cấu trúc vòng lactam. Các đột biến điểm xuất hiện trong quá trình tiến hóa của một số PBP làm sản sinh ra một loại enzym có tên là β -lactamase. Enzym này có khả

năng thủy phân vòng lactam của kháng sinh.

Hiện nay người ta đã phát hiện hơn 500 loại β -lactamase. Các enzym này khác nhau ở vị trí đột biến do đó chúng có khả năng kháng lại với các loại kháng sinh khác nhau ở các mức độ khác nhau. Các gen mã hóa cho gen này có thể nằm trên nhiễm sắc thể và di truyền qua các thế hệ hoặc nằm trên plasmid và lan truyền ngang giữa các loài vi khuẩn. Trên cùng một chủng vi khuẩn có thể tồn tại cả hai cơ chế di truyền này [24, 37, 44].

d. Kháng đa thuốc

Theo trung tâm phòng chống dịch bệnh châu Âu (ECDC) và trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh (CDC) thì kháng đa thuốc (MDR) được định nghĩa là không nhạy cảm với ít nhất một tác nhân trong 3 nhóm/phân nhóm kháng sinh trở lên [85]. Dựa vào độ nhạy cảm kháng sinh của các họ vi khuẩn với các nhóm kháng sinh mà các kháng sinh được sử dụng để đánh giá kháng đa thuốc của các họ vi khuẩn khác nhau [85]. Các kháng sinh để đánh giá kháng đa thuốc ở *Enterobacteriaceae* được trình bày trong bảng 1.2.

Bảng 1.2. Các kháng sinh để đánh giá kháng đa thuốc ở Enterobacteriaceae [85]

Nhóm / phân nhóm kháng sinh	Tên kháng sinh
Aminoglycoside	Gentamicin
	Tobramycin
	Amikacin
	Netilmicin
Cephalosporins chống MRSA	Ceftaroline
Penicillins phổ rộng + chất ức chế β -lactamase	Ticarcillin-clavulanic acid
	Piperacillin-tazobactam

Bảng 1.2 (tiếp)

Nhóm / phân nhóm kháng sinh	Tên kháng sinh
Carbapenem	Ertapenem
	Imipenem
	Meropenem
	Doripenem
Cephalosporin thế hệ 1,2	Cefazolin
	Cefuroxime
Cephalosporin phổ rộng thế hệ 3,4	Cefotaxime / Ceftriaxone
	Ceftazidime
	Cefepime
Cephameycin	Cefoxitin
	Cefotetan
Fluoroquinolone	Ciprofloxacin
Glycylcyclines	Tigecycline
Folate pathway inhibitors	Thimethoprim- Sulphamethoxazole
Monobactam	Aztreonam
Penicillin	Ampicillin
Penicillins+ β -lactamase inhibitors	Ampicillin - clavulanic acid
	Ampicillin-Sulbactam
Phenicol	Chloramphenicol
Phosphonic acid	Fosfomycin
Polymyxin	Colistin
Tetracycline	Tetracycline
	Doxycycline
	Minocycline

1.1.2.2. Tình hình kháng kháng sinh của *E. coli* trên người

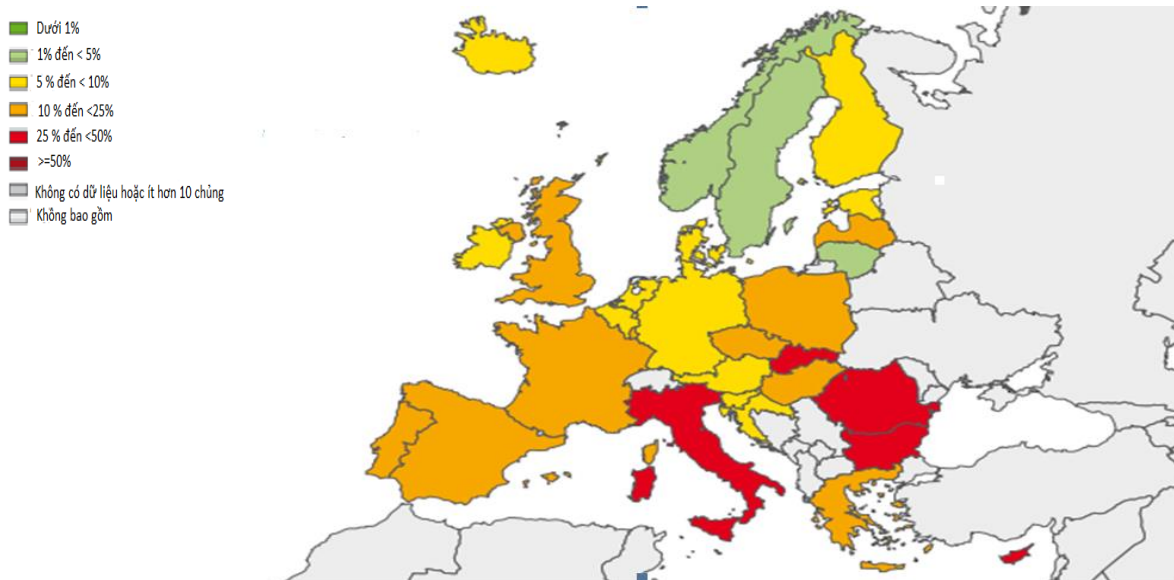
a. Trên thế giới

Trong những năm gần đây sự xuất hiện và lan truyền các vi khuẩn kháng kháng sinh đã và đang trở nên là mối đe dọa lớn với sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới. Do việc lạm dụng thuốc kháng sinh trong điều trị và sử dụng kháng sinh một cách không hợp lý trong cộng đồng đã tạo một sức ép chọn lọc làm vi khuẩn kháng kháng sinh. Mặt khác, việc sử dụng kháng sinh một cách lan tràn trong chăn nuôi cũng là một trong những nguyên nhân làm tăng khả năng xuất hiện vi khuẩn kháng kháng sinh. Thêm nữa là do toàn cầu hóa về cung cấp thực phẩm đã làm lan truyền các vi sinh vật kháng kháng sinh và chúng được lây truyền vào người thông qua chuỗi thực phẩm. Ngoài ra, những nhân tố di truyền di động như plasmid, transposon và integron có thể lan truyền các gen kháng kháng sinh theo chiều dọc hoặc chiều ngang giữa các vi khuẩn. Đồng thời, các nhân tố này còn đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển và lan truyền của đề kháng đa kháng kháng sinh ở vi khuẩn [127].

Theo số liệu thống kê của Tổ chức Y tế thế giới năm 2014 về tình hình kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* ở trong giai đoạn 2008 - 2013 cho thấy: *E. coli* đã kháng lại cephalosporin thế hệ thứ 3 ở hầu hết các khu vực trên thế giới với tỷ lệ dao động là 2-70%. Trong đó ở châu Phi là 2-48 %, châu Mỹ là 3 - 82%, châu Âu là 16- 68% và khu vực Đông Nam Á là 2-77% [127].

Trong báo cáo giám sát hàng năm của Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa bệnh tật Châu Âu (ECDC, 2011) về tình hình kháng cephalosporin thế hệ 3 của các chủng *E. coli* được phân lập từ các trung tâm y tế ở 30 nước châu Âu cho thấy tỷ lệ các chủng *E. coli* kháng với cephalosporin thế hệ thứ ba ở khu vực này dao động từ 3-36%. Trong đó tỷ lệ này khá cao ở các nước như Bulgaria (22,9%), Slovakia (31%) và Cyprus (36,2%), tuy nhiên tỷ lệ này lại thấp ở Thụy Điển (3,0%), Na Uy (3,6%) và Phần Lan (5,1%). Đặc biệt các chủng kháng với

cephalosporin thế hệ 3 thường kháng ít nhất ba nhóm kháng sinh, thậm chí ở một số nước Nam Âu đã xuất hiện các chủng *E. coli* sinh ESBL kháng carbapenem gây nên tình trạng kháng đa thuốc rất nguy hiểm [115].



Hình 1.1. Tỷ lệ (%) các chủng *E. coli* kháng cephalosporins thế hệ 3 ở các nước châu Âu, 2012 [115].

Nghiên cứu SMART tại châu Á năm 2007 cho thấy *E. coli* sinh ESBL kháng các kháng sinh cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone và ciprofloxacin với tỷ lệ rất cao (trên 70%). Đặc biệt tỷ lệ kháng các cephalosporin ở *E. coli* sinh ESBL cao hơn rất nhiều so với vi khuẩn không sinh ESBL [61].

Nghiên cứu của tác giả Villegas (2011) thực hiện trên các chủng vi khuẩn Gram âm phân lập từ các bệnh nhân nhiễm khuẩn ổ bụng tại 10 nước Mỹ Latinh cho thấy tỷ lệ kháng của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL với các kháng sinh như: cefepime, cefotaxim và ceftriaxon là trên 90%, trong khi tỷ lệ này ở nhóm *E. coli* không sinh ESBL là dưới 5%. Các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL có tỷ lệ kháng kháng sinh cao hơn so với các vi khuẩn không sinh ESBL [121].

Một số nghiên cứu gần đây cho thấy, hiện nay tình trạng các vi khuẩn Gram âm kháng colistin cũng đã xuất hiện ở một số nơi trên thế giới: Ở

Romani tỷ lệ kháng colistin ở *E. coli* là 11% và *Klebsiella* là 17%; ở Hy Lạp tỷ lệ này là 34% đối với *Enterobacteria*; đặc biệt ở khu vực châu Á tỷ lệ này khá cao từ 13,8% (ở Ấn Độ) đến 50% (ở Phillipine) [30]. Nghiên cứu của tác giả Hasman tại Đan Mạch năm 2015 đã phát hiện được gen *mcr-1* ở bệnh nhân nhiễm trùng máu và trong thực phẩm nhập khẩu [58]. Tại Canada tác giả Walkly thông báo phát hiện được các chủng *E. coli* kháng colistin không chỉ ở bệnh nhân nội trú mà cả ở bệnh nhân ngoại trú [122]. Nghiên cứu của tác giả Liu và cộng sự cũng phát hiện sự xuất hiện của gen *mcr-1* ở các chủng *E. coli* được phân lập từ người [81]. Một nghiên cứu tại Mỹ cũng phát hiện tình trạng kháng colistin của vi khuẩn *E. coli* được phân lập từ bệnh nhân nhiễm trùng tiết niệu [90].

b. Tình hình kháng kháng sinh tại Việt Nam

Việt Nam là một trong số các nước có tình hình kháng kháng sinh ở mức đáng lo ngại. Kết quả một số nghiên cứu cho thấy tỷ lệ kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* ở mức cao. Đặc biệt sự kháng kháng sinh của các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL ở mức báo động ở khắp các khu vực trong cả nước.

Theo báo cáo về thực trạng sử dụng kháng sinh của Bộ Y tế năm 2008-2009 tại 15 bệnh viện trong cả nước cho thấy 30-70% vi khuẩn gram âm đã kháng với kháng sinh nhóm cephalosporin thế hệ 3 và thế hệ 4, gần 40-60% kháng với nhóm aminoglycosid và fluoroquinolon, tình trạng kháng với carbapenem cũng đã xuất hiện [2].

Nghiên cứu của Cao Minh Nga (2013) tại bệnh viện 175 cho thấy *E. coli* sinh ESBL đã kháng nhóm cephalosporin (trừ cefoxitin) với tỉ lệ trên 50%, trong đó tỉ lệ kháng ceftazidime, cefuroxime, cefoperazone rất cao (trên 90%). Vi khuẩn này đã kháng lại meropenem với tỷ lệ 4,5%. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL đều là kháng đa thuốc, tỷ lệ kháng các loại kháng sinh của nhóm vi khuẩn sinh ESBL cao hơn đáng kể

so với nhóm vi khuẩn không sinh ESBL [14].

Kết quả nghiên cứu của Phan Thị Thu Hồng (2012) tại bệnh viện Bình Dân thành phố Hồ Chí Minh cho thấy các chủng *E. coli* sinh ESBL đã kháng lại hoàn toàn các kháng sinh cephalixin, cefuroxime, ceftriaxone, cefoperazone (tỷ lệ kháng 100%). Tỷ lệ kháng với ceftazidim, cefotaxime, cefepim lần lượt là 82,61%, 96,44% và 79,45%. Gentamycin và ciprofloxacin cũng bị kháng với tỷ lệ 69,17% và 84,19% [11].

Tại bệnh viện Nhi Đồng Cần Thơ, tác giả Hà Vũ Minh Trang (2013) thông báo tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL kháng cefotaxim là 100%, ceftazidime là 95,8%, trimethoprim/sulfamethoxazol là 97,2%, nhóm quinolon là trên 60%. Đặc biệt tất cả các chủng *E. coli* sinh ESBL đều là các chủng kháng đa thuốc với khả năng kháng lại đồng thời ít nhất bốn kháng sinh, trong đó tỷ lệ các chủng kháng lại trên 8 kháng sinh chiếm tới 81,7% [19].

Kết quả nghiên cứu của Mai Văn Tuấn tại bệnh viện Trung ương Huế năm 2008 cho thấy tỷ lệ kháng của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL với các kháng sinh ampicillin, cefotaxim và cephalothin lên tới 100%. Các kháng sinh như ceftazidime, gentamicin, ciprofloxacin, tetracyclin và bactrim bị kháng với tỷ lệ trên 65%. Tỷ lệ này cao hơn nhiều so với vi khuẩn *E. coli* không sinh ESBL [23].

Tại Hà Nội, tác giả Nguyễn Thái Sơn và cộng sự nghiên cứu tại bệnh viện 103 cho thấy: Tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng sinh ESBL cao hơn rõ rệt so với các chủng không sinh ESBL. Các chủng sinh ESBL kháng đồng thời nhiều kháng sinh đang gia tăng qua các năm (8,33% - 15,38% năm 2008, 18,75% - 25,0% năm 2009). Trong đó các chủng kháng đồng thời từ 6 - 8 kháng sinh là phổ biến nhất ở các chủng *E. coli* sinh ESBL kháng đa thuốc [18].

Nghiên cứu của Hoàng Thị Bích Ngọc ở trẻ em dưới 5 tuổi tại Hà Nội cho thấy tỷ lệ EAEC ở trẻ tiêu chảy kháng cao với kháng sinh thường dùng để

điều trị tiêu chảy như ampicillin 80,0%, trimethoprim/sulfamethoxazol 73,3% chloramphenicol 36,7%, nalidixic acid 20%. EAEC ở trẻ không tiêu chảy cũng đề kháng với các kháng sinh thường dùng để điều trị tiêu chảy như ampicillin 70,0%, trimethoprim/sulfamethoxazol 30,0%, chloramphenicol 10% [15].

Bên cạnh đó tình trạng vi khuẩn *E. coli* kháng colistin cũng được phát hiện ở một số nơi. Tại Tiền Giang tỷ lệ *E. coli* kháng colistin là 22,2 % và 22,4 % trên gà và trên lợn [97]. Tại Hà Nội cũng phát hiện một số chủng *E. coli* phân lập từ thực phẩm và động vật mang gen *mcr-1* kháng colistin [87]. Điều này nói lên tình trạng báo động về khả năng có thể xuất hiện tình trạng kháng colistin ở người.

Như vậy hiện nay vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL đã kháng lại nhiều kháng sinh thông dụng với tỷ lệ khá cao, đặc biệt các kháng sinh nhóm β -lactam có tỷ lệ rất cao. Hơn nữa tình trạng kháng các kháng sinh nhóm carbapemem và colistin ở vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL cũng là mối đe dọa lớn cho tình trạng kháng thuốc ngày càng lan rộng và trầm trọng.

1.2. Một số đặc điểm và phương pháp nghiên cứu *E. coli* sinh ESBL

1.2.1. Đặc điểm sinh học

Escherichia do nhà vi khuẩn học người Áo Theodor Escherich phát hiện lần đầu tiên vào năm 1885. Giống này gồm nhiều loài, trong đó *E. coli* có vai trò quan trọng nhất.

E. coli là trực khuẩn Gram âm, dễ nuôi cấy, tính chất sinh vật, hóa học rất phong phú. Vi khuẩn này có khả năng lên men nhiều loại đường như glucose, levulose, manose, lactose và có sinh hơi. *E. coli* có khả năng sinh indol, có khả năng khử carboxyl của lysin, ornitin; β galactosidase dương tính, không sinh H_2S , không sử dụng được nguồn cacbon của citrat trong môi trường Simmons [1, 17].

Cấu trúc kháng nguyên của *E. coli* rất phức tạp. Vi khuẩn này có 3 loại

kháng nguyên là: kháng nguyên thân (O), kháng nguyên lông (H) và kháng nguyên K. Trong đó kháng nguyên O là kháng nguyên quan trọng nhất, nó có bản chất là lipopolysaccharide, có khả năng chịu nhiệt và là nội độc tố của vi khuẩn. Dựa vào cấu trúc kháng nguyên người ta phân loại *E. coli* thành các type huyết thanh. Với mỗi kháng nguyên theo thứ tự O₁₋₁₇₃, H₁₋₄₀, K₁₋₁₀₀, sự tổ hợp các kháng nguyên O, H, K sẽ có rất nhiều type huyết thanh khác nhau [1, 17].

1.2.2. Đặc điểm và sự lưu hành các ESBL và các gen mã hóa sinh ESBL

1.2.2.1. Đặc điểm các ESBL và các gen mã hóa sinh ESBL

Các β -lactamase là các enzyme do vi khuẩn sinh ra, có khả năng làm bất hoạt các thuốc kháng sinh nhóm β -lactam bằng cách phá hủy nối amide của vòng β -lactam nên vi khuẩn mang các enzyme này có khả năng kháng kháng sinh rất hiệu quả. Trên toàn cầu, kháng sinh họ β -lactam được sử dụng nhiều nhất trong tất cả các nhóm, đặc biệt là từ khi các cephalosporine thế hệ thứ 3 được sử dụng rộng rãi trong điều trị nhiều bệnh nhiễm trùng, các biến đổi nhỏ trong chuỗi gen gốc đã làm thay đổi đáng kể tính ái lực của các enzyme đối với cơ chất, và đã hình thành một nhóm enzyme β -lactamase phổ mở rộng, hay còn được gọi là ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) thì vấn đề kháng với kháng sinh nhóm này rất đáng lo ngại [32].

ESBL thường được tìm thấy trong các vi khuẩn đường ruột, thường gặp ở *E. coli*. Các gen mã hóa cho các enzyme nhóm này thường nằm trên plasmid hoặc nhiễm sắc thể, do đó các gen có thể lan truyền từ loài này qua loài khác hoặc trong cùng loài. Hầu hết các hiện tượng kháng kháng sinh thường kết hợp với các yếu tố di truyền di động như plasmid, transposon, yếu tố IS (insertion element) và integron. Cơ chế đa dạng của sự truyền thông tin di truyền này góp phần phát tán các gen kháng kháng sinh một cách nhanh chóng [32, 37].

Có ba loại ESBL chính là TEM, SHV và CTX-M. Đây là các ESBL

được xem là phổ biến và có tầm ảnh hưởng rộng lớn nhất. Các loại ESBL này vẫn không ngừng biến đổi; ngày càng tăng về số lượng và phức tạp hơn về đặc tính. Hiện nay đã phát hiện hơn 500 loại ESBL [32].

ESBL loại TEM

TEM là enzyme β -lactamase do gen mã hóa nằm trên plasmid đầu tiên được mô tả năm 1960. Nó có hoạt tính thủy phân kháng sinh nhóm β -lactam. Enzyme này được tìm thấy ở chủng *E. coli* phân lập được trong máu một bệnh nhân người Hy Lạp tên là *TEMoniera* nên được gọi là TEM. TEM-1 là β -lactamase thường gặp nhất ở các chủng trực khuẩn Gram âm. TEM-2 là dẫn xuất đầu tiên của TEM-1, có sự thay thế một acid amin so với β -lactamase nguyên thủy. Các TEM-1 và TEM-2 gây ra tình trạng kháng với các penicillin. Các biến thể khác nhau của TEM có nguồn gốc từ TEM-1 và TEM-2, chúng được hình thành do các đột biến điểm và là sản phẩm của sự thay thế từ 1 đến 7 acid amin, thường ở các vị trí 39, 104, 164, 238 và 240. Các biến thể này có hoạt lực khác nhau với các cephalosporin, TEM-3 có hoạt lực mạnh chống lại cefotaxime và ceftazidime. Trong khi đó TEM-10 và TEM-26 ít có hoạt lực chống lại cefotaxime và ceftriaxone. Các gen mã hóa cho enzyme này có thể lan truyền từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác qua trung gian plasmid và transposon. Ngày nay, hơn 170 thành viên của loại enzyme này được mô tả [25, 32, 35].

ESBL loại SHV

SHV-2 là loại ESBL được phát hiện đầu tiên trên vi khuẩn *Klebsiella ozaenae* tại Đức (1983). SHV chịu trách nhiệm cho sự kháng với ampicillin qua trung gian plasmid ở *K. pneumoniae*. Các SHV đều bắt nguồn từ SHV-1 và được hình thành do sự đột biến điểm, đột biến mất hoặc đột biến chèn. SHV-2 khác SHV-1 bởi thay thế một amino acid tại vị trí 238 (Gly238Ser), có khả năng thủy phân hiệu quả cefotaxime và kém hiệu quả với ceftazidime. Một số biến thể của SHV-5 do thay thế glutamat bằng lysin ở vị trí 240 (Glu

230Lys). Điều thú vị là 2 vị trí này đều được thay thế giống với sự thay thế ở TEM-ESBL. Serin ở vị trí 238 quyết định khả năng ly giải CAZ và lysin ở vị trí 240 quyết định khả năng ly giải CTX. Ngày nay phần lớn các biến thể của SHV có biểu hiện kiểu hình của ESBL. Tuy nhiên một biến chủng của SHV là SHV-10 lại có kiểu hình kháng chất ức chế. Đây là một biến thể của SHV-5 do thay thế serin ở vị trí 130 thành glycine. SHV-1 thường được tìm thấy ở *Klebsiella* và *E. coli*. Gen mã hóa cho gen SHV-1 ở *E. coli* nằm trên plasmid. Hiện đã phát hiện 126 thể đột biến của SHV, trong đó thường gặp là SHV-5 và SHV-12 [25, 32, 35].

ESBL loại CTX-M

Các enzyme CTX-M là loại ESBL có khả năng thủy phân hiệu quả cefotaxim. CTX-M có khả năng thủy phân cephalothin tốt hơn so với benzyl - penicillin và cefotaxim tốt hơn ceftazidim. Các gen mã hóa cho CTX-M nằm trên plasmid loại IncF, loại có khả năng tiếp hợp cao, có kích thước từ 50 kb đến 200 kb. Gen *blaCTX-M* được xác định nằm dưới vùng trình tự gắn chèn ISEcp1, trình tự giúp cho gen có khả năng chèn vào một đoạn DNA khác dễ dàng. Hiện nay đã có 128 loại CTX-M được phát hiện và được chia thành 5 phân nhóm, mỗi phân nhóm chứa các enzyme đặc trưng: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 và CTX-M-25. Một chủng vi khuẩn có thể mang gen mã hóa đồng thời CTX-M, TEM và SHV hoặc CTX-M và AmpC, điều này có thể làm biến đổi kiểu hình kháng kháng sinh [25, 32, 35, 48].

Ngoài ra còn có một số loại ESBL khác như: OXA, VEB, GES, IBC, PER, TLA, BES và SFO. Tuy nhiên các loại ESBL này ít gặp [32, 48].

1.2.2.2. Sự lưu hành của các ESBL và các gen mã hóa sinh ESBL

Từ khi được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1983 tại Đức, ESBL nhanh chóng lan rộng khắp châu Âu, sau đó lan sang châu Mỹ và các nước châu Á, hiện nay ESBL được tìm thấy ở hầu hết các châu lục trên thế giới. Do nằm trên

plasmid, ESBL dễ dàng được truyền từ loài này qua loài khác hoặc trong cùng loài. Bên cạnh đó các plasmid mang gen ESBL còn mang kèm các gen kháng kháng sinh khác, tạo nên sự đồng kháng, chính vì vậy vi khuẩn có ESBL không chỉ kháng với β -lactamase mà còn kháng với nhiều kháng sinh thuộc các nhóm khác như nhóm Quinolones, sulphonamid và aminoglycosides [24, 27, 52, 101].

Trong suốt những năm 1990, hầu hết các báo cáo về ESBL đều tập trung vào TEM, SHV-loại ESBL có liên quan đến lây nhiễm chéo trong bệnh viện. Tuy nhiên những báo cáo gần đây cho thấy chủ yếu xuất hiện các ESBL loại CTX-M [32, 44, 48, 60] .

Kết quả giám sát kháng sinh cho thấy sự xuất hiện ESBL phổ biến nhất ở châu Á và châu Mỹ La tinh, tiếp đó ở châu Âu và thấp nhất ở khu vực Bắc Mỹ. Tại các nước châu Âu, sự xuất hiện của ESBL rất đa dạng nhưng phổ biến nhất là CTX-M, SHV và TEM. Trong đó ở khu vực Bắc Âu thường gặp nhất là các enzyme CTX-M-15, CTX-M-9, SHV-5, SHV-2; ở các nước Nam Âu thì thấy xuất hiện chủ yếu là các enzyme CTX-M-15, CTX-M-32, TEM-24, SHV-12; trong khi ở các nước Đông Âu CTX-M-3, SHV-2 và SHV-5 là những enzyme được phát hiện nhiều nhất [60, 101].

Các ESBL loại CTX-M ngày càng chiếm ưu thế trên các vi khuẩn Gram âm, đặc biệt là trên *E. coli* và *K. pneumoniae* không chỉ ở châu Âu mà còn ở châu Á và châu Mỹ La tinh. Các gen *blaCTX-M* (gen mã hóa sinh CTX-M) chiếm đến 83% ở vi khuẩn *E. coli*, trong khi *blaSHV* (gen mã hóa sinh SHV) chỉ chiếm 28% và *blaTEM* (gen mã hóa sinh TEM) chiếm tỉ lệ không đáng kể trong một nghiên cứu đa quốc gia trên các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL năm 2008. Nghiên cứu này đã cho thấy được khuynh hướng phân bố ESBL trên thế giới, nhất là sự phân bố phổ biến và rộng khắp của CTX-M-15 [60]. Ngoài ra, còn có các ESBL loại VEB, GES/ABC, PER, TLA, BES và SFO hiện diện với tỉ lệ thấp [51, 77].

SHV là loại chủ yếu ở châu Á vào những năm 1990, đặc biệt là SHV-5 và SHV-12 rất phổ biến ở Nhật và Hàn Quốc cho đến nay [79, 93].

Kết quả một nghiên cứu ở Trung Quốc năm 2009 đã cho thấy *blaTEM* và *blaCTX-M* có tần số xuất hiện cao nhất (77,8% và 50%) trên vi khuẩn *E. coli*. Một vài chủng vi khuẩn có thể mang một lúc đến 6 gen mã hóa sinh ESBL trong đó chủ yếu là các gen mã hóa sinh TEM-1, TEM-11, SHV-13, SHV-28, CTX-M-9, CTX-M-22, CTX-M-55, OXA-1, LEN, OKP-6 và DHA-1. Sự xuất hiện nhiều gen mã hóa sinh ESBL trên cùng một chủng vi khuẩn làm thay đổi kiểu hình kháng kháng sinh và gây khó khăn trong việc xác định kiểu hình ESBL [78].

Ở Việt Nam, có rất ít các nghiên cứu về những gen chịu trách nhiệm sinh ESBL cũng như plasmid mang các gen này. Nghiên cứu của tác giả Van Cao và cộng sự năm 2001 tại thành phố Hồ Chí Minh cho thấy sự xuất hiện của gen mã hóa sinh TEM là phổ biến nhất (76,3%), tiếp đến là SHV (38,1%), CTX-M và VEB-1 cùng chiếm tỉ lệ 25,5%. Các gen này có thể xuất hiện độc lập hoặc kết hợp nhiều gen trong cùng một vi khuẩn sinh ESBL. Trong đó, chủ yếu là các gen mã hóa sinh TEM-1, SHV-1, SHV-2, CTX-M-14, CTX-M-17 và VEB-1 ở các vi khuẩn *E. coli* và *K. pneumoniae* [36].

Nghiên cứu của tác giả Nguyễn Hoàng Thu Trang và cộng sự trên các chủng *E. coli* và *Klebsiella* sinh ESBL phân lập tại bệnh viện tại ở Thành phố Hồ Chí Minh (2010) cho thấy sự xuất hiện của các gen *blaCTX-M* được phát hiện ở 100% các chủng, *blaTEM* được phát hiện ở 75% các chủng, không thấy sự xuất hiện của *blaSHV*. Trong các gen *blaCTX-M* thì thấy gen mã hóa sinh CTX-M-15 và CTX-M-27 xuất hiện nhiều nhất, ngoài ra còn có sự xuất hiện của các gen mã hóa sinh các CTX-M khác như CTX-M-3, CTX-M-55, CTX-M-14 [20].

Nghiên cứu của Nakayama cho thấy 47,0% người dân tham gia nghiên

cứu ở Ba Vì, Hà Nội mang gen *blaCTX-M*, trong đó *blaCTX-M-9* và *blaCTX-M-1* là 2 nhóm gen phổ biến [95].

1.2.3. Đặc điểm phân nhóm phát sinh loài (*phylogenetic group*)

Vi khuẩn *E. coli* được chia thành 4 nhóm phát sinh loài gồm: A, B1, B2 và D, mỗi nhóm có đặc điểm về môi trường sinh thái, ký chủ, khả năng gây bệnh và khả năng kháng kháng sinh khác nhau [63].

Escobar-Páramo & cs (2006) đã chứng minh sự lưu hành của nhóm B2 và A là phổ biến ở người, nhóm A và B1 chiếm ưu thế hơn so với nhóm D và B2 ở động vật có vú, trong khi nhóm B1 và D lại phổ biến ở gia cầm. Nghiên cứu này cũng cho thấy các chủng *E. coli* thuộc nhóm B2 và D thường mang gen độc lực hơn các chủng thuộc nhóm A và B1. Các chủng gây bệnh lý ngoài đường ruột chủ yếu thuộc nhóm B2 và một số ít thuộc nhóm D trong khi các chủng *E. coli* cộng sinh ở đường ruột chủ yếu thuộc nhóm B1 và A [48].

Liên quan đến đặc điểm kháng kháng sinh của các nhóm phát sinh loài, kết quả nghiên cứu của Johnson (2005) trên 100 chủng *E. coli* phân lập từ nước tiểu của 100 phụ nữ có viêm bàng quang cho thấy: Tỷ lệ kháng ciprofloxacin cao nhất ở nhóm A, tiếp theo ở nhóm D, nhóm B1 và B2 không phát hiện tình trạng kháng ciprofloxacin [68].

Nghiên cứu của tác giả Chakraborty (2015) ở 300 chủng *E. coli* gây nhiễm trùng ngoài đường ruột cho kết quả: Nhóm B2 và D là 2 nhóm thường gây nhiễm trùng tiết niệu và nhiễm khuẩn huyết. Nhóm A và B1 có tiên lượng tốt khi điều trị. Nhóm B2 và D thường gây điều trị thất bại hoặc dẫn tới tử vong. Nhóm A và B1 có tỷ lệ kháng ciprofloxacin cao hơn 2 nhóm còn lại. Tuy nhiên tỷ lệ kháng với ampicillin và cefotaxime ở nhóm B2 và D lại cao hơn. Tỷ lệ đa kháng (kháng với ít nhất 3 kháng sinh) ở nhóm B1 lại cao hơn các nhóm khác [40].

Ở Việt Nam, nhóm phát sinh loài của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL

được một số tác giả thông báo. Nghiên cứu của Lê Quốc Phong và cộng sự cho thấy trong thực phẩm tại Nha Trang *E. coli* thuộc nhóm B1 chiếm tỷ lệ cao nhất (53,5%), tiếp theo là nhóm A (22,5%) và nhóm D (19%), nhóm B2 chỉ chiếm tỷ lệ nhỏ (4,5%) [102].

Nghiên cứu của Bùi Mai Hương ở người khỏe mạnh tại Hà Nội cho thấy nhóm D và A là những nhóm phát sinh loài phổ biến, nhóm B1, B2 chiếm tỷ lệ thấp [65].

1.2.4. Đặc điểm gây bệnh của vi khuẩn *E. coli* trên người

Bình thường *E. coli* là vi khuẩn sống trong đại tràng của người và động vật, chiếm khoảng 80% tổng số vi khuẩn hiếu khí ở ruột và không gây bệnh. Tuy nhiên, khi có điều kiện thuận lợi, một số nhóm *E. coli* gây độc tăng sinh, sản xuất các yếu tố độc lực gây bệnh cho người và động vật.

E. coli là một trong những căn nguyên gây ra các bệnh tiêu chảy, viêm đường tiết niệu, nhiễm khuẩn huyết, viêm phổi ở trẻ sơ sinh. Trong đó tiêu chảy là hội chứng hay gặp nhất liên quan đến khả năng gây bệnh của *E. coli* [1, 17].

Khả năng gây bệnh của *E. coli* phụ thuộc vào các yếu tố độc lực và độc tố của chúng vì vậy mỗi nhóm *E. coli* gây tiêu chảy và có khả năng gây bệnh bằng các cơ chế khác nhau tùy thuộc vào yếu tố độc lực chúng mang.

ETEC (Enterotoxigenic *E. coli* - *E. coli* sinh độc tố ruột): là nguyên nhân đứng đầu trong các tác nhân gây tiêu chảy. ETEC gồm những *E. coli* tạo ra ít nhất một trong hai độc tố ruột là ST và LT. Các *E. coli* thuộc nhóm này gây bệnh bằng cách vi khuẩn bám vào bề mặt màng nhày ruột non và tiết ra độc tố ruột, làm gia tăng tình trạng tiết dịch gây tiêu chảy cấp dạng tả [1, 17].

EIEC (Enteroinvasive *E. coli* - *E. coli* xâm nhập đường ruột): các *E. coli* nhóm này có khả năng xâm nhập vào biểu mô kết tràng và tiết ra một hay nhiều độc tố ruột liên quan đến tiêu chảy, gây hội chứng lỵ [1, 17].

EAEC (Enteroadherent *E. coli* - *E. coli* gây bám dính kết tập ruột): là nhóm *E. coli* không sinh enterotoxin, gây bệnh do bám và xâm lấn vào niêm

mạc ruột non, làm tổn thương chức năng ruột. Hậu quả là gây tiêu chảy cấp hay kéo dài. Tất cả các EAEC đều có plasmid chứa gen tạo tổn thương kiểu bám dính và gen mã hóa cho độc tố ruột EAST1. Ngoài ra EAEC còn có những yếu tố độc lực khác như haemolysin, các độc tố liên quan đến quá trình bám dính như lông và những protein màng ngoài [1, 53, 71].

EHEC (Enterohemorrhagic *E. coli* - *E. coli* gây xuất huyết đường ruột): Cơ chế gây bệnh có liên quan đến loại độc tố có cấu trúc kháng nguyên và cơ chế tác động giống với ngoại độc tố của *Shigella*. EHEC có hai loại gồm các EHEC điển hình (O157: H7) và không điển hình (EHEC non O157). Các EHEC O157: H7 thường gây tiêu chảy kèm theo viêm đại tràng xuất huyết và hội chứng tan máu urê huyết cao [1, 53, 71].

EPEC (Enteropathogenic *E. coli* - *E. coli* gây bệnh đường ruột): tác động vào tế bào biểu mô niêm mạc ruột làm thoái hóa các vi nhung mao làm rối loạn quá trình hấp thu nước và điện giải tại đây và gây tiêu chảy [17, 76].

DAEC (Diffusely adherent *E. coli* - *E. coli* gây bám dính phân tán): cơ chế gây bệnh chưa được hiểu rõ, độc tố EAST1 của DAEC gây phá hủy tế bào biểu mô ruột [17, 76].

Trong các nhóm *E. coli*, nhóm EHEC gây bệnh cho mọi lứa tuổi và là một trong những thủ phạm chính của ngộ độc thực phẩm. Nhóm EIEC thường gây ra những vụ dịch tiêu chảy hoặc nhiễm trùng chéo tại bệnh viện. Nhóm EPEC, ETEC thường lưu hành phổ biến ở người và gây tiêu chảy ở trẻ em.

Các vi khuẩn *E. coli* mang gen độc lực không chỉ lưu hành ở các bệnh nhân tiêu chảy mà còn xuất hiện ở cả người khỏe mạnh. Nghiên cứu Bueris và cộng sự (2007) ở 1207 mẫu phân trẻ em tại Brazil cho thấy: Các chủng *E. coli* gây tiêu chảy như EAEC, EPEC, ETEC, STEC xuất hiện ở các bệnh nhân tiêu chảy và các bệnh nhân không tiêu chảy với tỷ lệ tương đương nhau [34].

Một nghiên cứu khác được thực hiện ở trẻ em mới sinh ở Jordan cho

thấy, một tỷ lệ khá lớn các chủng *E. coli* được phân lập từ mẫu phân của các trẻ em này mang các yếu tố độc lực [59].

Tác giả Wang và cộng sự (2015) cũng thông báo phát hiện các gen độc lực của EAEC ở người già khỏe mạnh. Hơn nữa các gen này còn xuất hiện đồng thời với các gen mã hóa sinh ESBL với tỷ lệ khá cao (54/84 trường hợp). Điều này gợi ý về khả năng lan truyền đồng thời cả gen kháng thuốc và gen độc lực giữa các chủng *E. coli* [125].

Tại Việt Nam, tác giả Đỗ Thị Thu Hương nghiên cứu trẻ em bị tiêu chảy ở trẻ em tại 1 số bệnh viện ở Hà Nội cho thấy tỷ lệ *E. coli* gây tiêu chảy là 24,9% trong đó EAEC chiếm tỉ lệ cao nhất là 15,9%, tiếp theo lần lượt là EPEC (3,8%), EHEC (2,8), EIEC (1,9%) và ETEC (0,5%). Trong nhóm lành có 6 trẻ phân lập được EAEC (6,0%), 1 trẻ nhiễm ETEC (1%) và 2 trẻ nhiễm EPEC (2%) [12].

Nghiên cứu của Hoàng Thị Bích Ngọc thông báo tỷ lệ xuất hiện gen độc lực ở trẻ em tiêu chảy với tỷ lệ khá cao, thậm chí có chủng mang đồng thời nhiều gen độc lực (62,5% số chủng EAEC mang 3 loại gen và 4,2% số chủng mang 4 loại gen). Tác giả này cũng báo cáo ở các trẻ không tiêu chảy có 33,3% số chủng mang 2 loại gen, 11,1% số chủng EAEC mang 3 loại gen [15].

Gần đây có một số nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm hiểu mối liên quan giữa sự xuất hiện các gen độc lực của *E. coli* với tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn này. Nghiên cứu của González trên gia súc cho thấy những chủng vi khuẩn kháng đa thuốc thường được phát hiện ở các chủng không hoặc ít có độc lực. Điều này gợi ý rằng tỷ lệ thấp các yếu tố độc lực có thể phù hợp với tình trạng kháng đa thuốc [53]. Tuy nhiên kết quả một nghiên cứu khác lại cho thấy các chủng STEC có khả năng kháng kháng sinh cao hơn các chủng Non STEC [99].

Kết quả nghiên cứu của tác giả Mashayekhi và cs (2014) trên các chủng

E. coli phân lập ở trẻ em nhiễm khuẩn tiết niệu cho thấy: Các yếu tố độc lực có phân bố thấp ở các chủng kháng đa kháng sinh [89].

Như vậy từ các nghiên cứu trên cho thấy có sự lưu hành của các gen độc lực của các chủng *E. coli* trên người khỏe mạnh. Các kết quả nghiên cứu cũng cho thấy mặc dù mối liên quan giữa các gen kháng kháng sinh và gen độc lực ở các chủng *E. coli* chưa được sáng tỏ nhưng đã có nhiều bằng chứng cho thấy mối liên quan giữa sự xuất hiện các gen độc lực và khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn *E. coli*. Vì vậy việc tìm hiểu vai trò của sự xuất hiện các gen độc lực trong cơ chế gây bệnh và khả năng kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* trên người khỏe mạnh là hết sức cần thiết. Qua đó phát hiện sớm những người mang các gen độc lực có khả năng gây bệnh, đặc biệt là các gen độc lực nguy hiểm có thể gây ra các vụ tiêu chảy hàng loạt và nguy hiểm cho cộng đồng. Đồng thời tìm hiểu mối liên quan giữa các gen độc lực và sự kháng kháng sinh ở vi khuẩn *E. coli* trong cộng đồng. Từ những thông tin đó góp phần đưa ra các biện pháp nhằm hạn chế sự lan truyền các vi khuẩn kháng kháng sinh và gây tiêu chảy trong cộng đồng.

1.2.5. Khả năng lan truyền vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL

Các vi khuẩn kháng thuốc được tìm thấy khắp nơi kể cả những nơi chưa bao giờ sử dụng kháng sinh. Sự hình thành tính kháng thuốc ở vi sinh vật là do sự biến đổi gen ở nhiễm sắc thể hoặc do tiếp nhận plasmid mang gen kháng thuốc [1, 17].

Các gen mã hóa sinh ESBL chủ yếu nằm trên các plasmid, một số gen nằm trên transposon, integrin hoặc nhiễm sắc thể. Do đó vi khuẩn có thể truyền dọc các gen từ thế hệ vi khuẩn này sang thế hệ sau qua sự nhân lên (phân chia của tế bào) thông qua vai trò của nhiễm sắc thể và plasmid, hoặc truyền ngang các plasmid và các yếu tố di truyền động như transposon, intergron chứa gen mã hóa sinh ESBL từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác trong cùng một loài

hoặc khác loài thông qua các hình thức vận chuyển di truyền như tiếp hợp khi hai vi khuẩn tiếp xúc trực tiếp với nhau, biến nạp khi vi khuẩn bị ly giải và giải phóng ra DNA tự do hoặc tải nạp nhờ phage hoặc do một thành phần di truyền động (transposon) [1, 17]. Cơ chế đa dạng của sự truyền thông tin di truyền này góp phần phát tán các gen kháng kháng sinh một cách nhanh chóng. Trong các cơ chế trên, cơ chế truyền các gen kháng kháng sinh thông qua plasmid là cơ chế lan truyền quan trọng nhất do phần lớn các gen mã hóa sinh ESBL nằm trên các plasmid và có thể lây truyền trong phạm vi loài và truyền sang các loài vi khuẩn khác thông qua hình thức tiếp hợp [52, 101].

Một số nghiên cứu cho thấy các plasmid R là nguồn lây lan ESBL chủ yếu. Nghiên cứu của tác giả Shukla tại Ấn Độ đã chứng minh sự chuyển đổi kháng thuốc qua trung gian ESBL với cefotaxime cùng với việc chuyển gentamicin và các thuốc kháng sinh β -lactam khác [112].

Trong một nghiên cứu được tiến hành tại Pháp vào năm 1996, việc kết hợp giữa *Klebsiella pneumoniae* RIC và *Escherichia coli* K12 J53-2 kháng rifampin hoặc *Escherichia coli* K12 C600 kháng acid nalidixic đã được thực hiện. Tỷ lệ chuyển các yếu tố kháng β -lactam từ các tế bào cho sang tế bào nhận là 10^{-7} . Có sự đồng chuyển các yếu tố kháng aminoglycosid, tetracyclines, chloramphenicol, trimethoprim và sulfonamides [66].

1.2.6. Các phương pháp nghiên cứu *E. coli* sinh ESBL

1.2.6.1. Các phương pháp chẩn đoán *E. coli* sinh ESBL

a. Các phương pháp vi sinh lâm sàng

Có nhiều phương pháp để phát hiện vi khuẩn sinh ESBL. Tuy nhiên phần lớn các phương pháp này đều dựa trên nguyên lý so sánh sự kháng của vi khuẩn với cephalosporin khi có và không có mặt chất ức chế. Kết quả đánh giá dựa vào tiêu chuẩn của CLSI.

** Phương pháp khoan giấy kết hợp*

Thử nghiệm xác nhận được thực hiện trên nguyên tắc tìm tác dụng hiệp lực giữa đĩa ceftazidime 30µg (CAZ) và ceftazidime/acid clavulanic 30/10 µg (CAZ-C) hoặc cefotaxime 30µg (CTX) và cefotaxim/acid clavulanic 30/10 µg (CTX-C). Nếu đường kính vòng kháng khuẩn của đĩa cephalosporin/acid clavulanic $\geq 5\text{mm}$ so với đường kính vòng kháng khuẩn của đĩa cephalosporin thì chủng đó được xác định là mang kiểu hình ESBL [43].

Đây là một kỹ thuật đơn giản, rẻ tiền, dễ thực hiện, có độ nhạy và đặc hiệu cao trên 95%, có thể được sử dụng lồng ghép với kỹ thuật kháng sinh đồ như một xét nghiệm thường quy tại các phòng vi sinh lâm sàng. Tuy vậy không phát hiện được một số vi khuẩn có ESBL giảm ức chế acid clavulanic thường gặp như OXA.

** Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitor Concentrate - MIC) của kháng sinh*

Trong phương pháp này các kháng sinh được pha loãng theo thường quy ở các nồng độ khác nhau: CAZ (0,25 - 128 µg/ml) và CAZ cộng thêm CLA (0,25/4 - 128/4 µg/ml); CTX (0,25 - 64µg/ml) và CTX cộng thêm CLA (0,25/4 - 64/4 µg/ml). Có thể dùng cả 2 loại CAZ và CTX. Kháng định vi khuẩn sinh ESBL khi có sự giảm MIC ≥ 3 lần nồng độ pha loãng bậc hai của cephalosporin có thêm CLA so với MIC của cephalosporin đơn độc [43].

Phương pháp này không chỉ phát hiện được các chủng ESBL mà còn phát hiện được mức độ kháng của vi khuẩn với kháng sinh đó từ đó có thể tính toán chính xác liều điều trị trên lâm sàng.

** Phương pháp sử dụng băng giấy E-test ESBL*

Phương pháp này sử dụng các băng giấy E-test hai chiều. Một nửa chứa các nồng độ kháng sinh cephalosporins (CTX, CAZ) phổ rộng được pha loãng từ thấp đến cao, tính bằng µg/ml. Nửa còn lại chứa cephalosporin phổ rộng đó

kết hợp clavulanic (CAZ/CLA, CTX/CLA) ở các nồng độ tương đương với đầu kia. Nghi ngờ sự có mặt của ESBL khi có sự giảm MIC hơn gấp 3 lần nồng độ pha loãng bậc hai cephalosporin có chất ức chế so với cephalosporin đơn độc [45].

Đây là kỹ thuật đơn giản, dễ tiến hành, cho kết quả chính xác nhất hiện nay được dùng để khẳng định ESBL (+).

** Phương pháp sử dụng máy tự động (Vitek, BD Phoenix)*

Hệ thống máy tự động như Vitek, BD Phoenix sử dụng các bản gel card chứa cephalosporin và acid clavulanic. Việc phát hiện ESBL dựa trên các test kết hợp đánh giá sự tăng trưởng của vi khuẩn với sự có mặt của cephalosporin riêng rẽ hoặc kết hợp với acid clavulanic (CA). Các phần mềm trong máy sẽ tự động phân tích và báo kết quả về ESBL và MIC [49, 82, 107].

Kỹ thuật này dễ sử dụng, cho kết quả nhanh, kèm theo kháng sinh đồ MIC, thuận tiện cho việc thực hiện số lượng nhiều mẫu cùng lúc nhưng đòi hỏi phải có máy định danh và giá thành đắt.

** Phương pháp sử dụng thanh thử Micro scan panels*

Phương pháp này sử dụng các tấm panel nhựa có chứa kháng sinh CAZ hoặc CTX đơn thuần và có cho thêm chất ức chế β -lactamase ở các nồng độ kháng sinh khác nhau. Huyền dịch vi khuẩn được đưa vào các tấm panel, và tiến hành nuôi cấy. ESBL được cho là dương tính khi MIC của CTX hoặc CAZ có thêm chất ức chế giảm 3 lần nồng độ bậc 2 so với MIC của cephalosporin đơn độc [75]. Độ nhạy và độ đặc hiệu cao nhưng giá thành đắt nên hiện ít được áp dụng tại Việt Nam.

b. Các phương pháp sinh học phân tử

** Phương pháp Oligotyping*

Đây là phương pháp sinh học phân tử đầu tiên được sử dụng để định loại β -lactamase. Phương pháp này sử dụng các đầu dò oligonucleotide được

thiết kế để phát hiện điểm đột biến của gen *TEM* dưới sự lai ghép chặt chẽ [84]. Phương pháp này đặc hiệu cho nhóm gen *TEM* và một số biến chủng đặc hiệu của *TEM*. Nhưng đòi hỏi phải có đầu dò đặc hiệu, chi phí cho phòng thí nghiệm tốn kém.

*Phản ứng PCR

Là kỹ thuật sinh học phân tử đơn giản nhất và thông dụng nhất được dùng để phát hiện sự có mặt của gen β -lactamase với các cặp môi oligonucleotid được thiết kế đặc hiệu cho một gen β -lactamase. Các gen mã hóa sinh ESBL có thể được thực hiện bằng phản ứng PCR đơn môi hoặc đa môi [32, 111].

*Phương pháp đa hình chiều dài các đoạn cắt bởi enzyme giới hạn (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP)

Các sản phẩm khuếch đại của phản ứng PCR được cắt bởi các enzym giới hạn, sau đó các đoạn DNA sản phẩm của quá trình cắt được tách ra bằng điện di. Kích cỡ của các mảnh DNA được tạo ra bởi mỗi enzyme giới hạn sẽ chỉ ra các đột biến điểm trong gen mã hóa *TEM*, *SHV* [111]. Phương pháp này dễ thực hiện, có thể phát hiện được sự thay đổi của các nucleotid đặc biệt.

* Phương pháp PCR single-strDNA conformational polymorphism (PCR-SSCP).

Trong kỹ thuật này, một đoạn gen mã hóa cho *SHV* được tổng hợp bằng phản ứng PCR. Sau đó các sản phẩm của phản ứng này được cắt bởi enzym giới hạn PstI. Các gen mã hóa cho *SHV*1, 2, 3, 4,5, và 7-lactamases có thể được xác định bằng điện di các sản phẩm [83]. Kỹ thuật này có thể phân biệt được một số biến chủng của *SHV* nhưng đòi hỏi điều kiện đầu dò đặc hiệu.

*Phát hiện ESBL bằng phản ứng chuỗi Ligase (Ligase Chain Reaction)

Trong kỹ thuật này, DNA đích chứa gen *blaSHV* bị biến tính trong một máy luân nhiệt và gắn với các môi oligonucleotide biotinylated để phát hiện các đột biến ở 4 vị trí. Sản phẩm LCR được phát hiện bởi một phản ứng

enzyme sử dụng phosphatase NADPH-alkaline. Kỹ thuật này có thể phát hiện được bảy biến thể của *SHV* [73].

* Phương pháp giải trình tự gen (Sequencing)

Phương pháp giải trình tự DNA là phương pháp xác định trình tự sắp xếp các nucleotid trong phân tử DNA. Phương pháp này được thực hiện theo nguyên tắc tạo ra các mảnh DNA được đánh dấu tại đầu 5' hoặc 3'. Các mảnh có các base đánh dấu được tách ra trên gel polyacrylamid. Các mảnh được phân biệt về vị trí trên gel với sự sai khác chỉ với một nucleotid. Đây là phương pháp được coi là “tiêu chuẩn vàng” để chứng minh sự có mặt của gen mã hóa sinh ESBL đặc hiệu ở vi khuẩn [111]. Tuy nhiên phương pháp này đòi hỏi phải có trang thiết bị máy móc hiện đại, đắt tiền. Cán bộ kỹ thuật phải được đào tạo bài bản, giá thành đắt.

Mỗi phương pháp có những ưu và nhược điểm riêng. Tùy mục đích và điều kiện phòng thí nghiệm mà có thể sử dụng phương pháp khác nhau. Ưu và nhược điểm của mỗi phương pháp chẩn đoán *E. coli* sinh ESBL được thể hiện qua bảng 1.3 dưới đây.

Bảng 1.3. Ưu, nhược điểm của các phương pháp phát hiện *E. coli* sinh ESBL

Loại kỹ thuật	Phương pháp	Ưu điểm	Nhược điểm
Vi sinh lâm sàng	Khoanh giấy kết hợp	Đơn giản, rẻ tiền, dễ thực hiện.	Âm tính giả với các ESBL hoạt tính thấp.
	Xác định MIC	Dễ nhận định kết quả	Tốn thời gian
	E-test	Kỹ thuật đơn giản, dễ tiến hành. Độ nhạy cao	Giá thành cao
	Sử dụng máy tự động	Dễ thực hiện, cho kết quả nhanh	Độ nhạy và độ đặc không cao, cần có máy định danh
	Thanh thử Micro scan	Dễ sử dụng, cho kết quả nhanh	Giá thành đắt
Sinh học phân tử	Oligotyping	Phát hiện được các biến chủng đặc hiệu của TEM	Phải có đầu dò đặc hiệu. Chi phí tốn kém.
	PCR	Dễ thực hiện, độ nhạy, độ đặc hiệu cao	Không phân biệt được các biến chủng.
	RFLP	Dễ thực hiện, có thể phát hiện được sự thay đổi của các nucleotid đặc biệt.	Sự thay đổi của các nucleotid phải biểu hiện trên các vị trí bắt buộc để phát hiện được.
	PCR-SSCP	Có thể phân biệt được một số biến chủng của SHV	Phải có đầu dò đặc hiệu. Kỹ thuật phức tạp
	Ligase Chain Reaction	Có thể phân biệt giữa một số biến chủng của SHV	Đòi hỏi số lượng lớn các cặp mồi.
	Sequencing	Là “tiêu chuẩn vàng”, có thể phát hiện tất cả các biến thể	Giá thành đắt, kỹ thuật phức tạp, trang thiết bị đắt tiền

1.2.6.2. Các phương pháp sinh học phân tử nghiên cứu *E. coli* sinh ESBL

* Kỹ thuật điện di xung trường (PFGE)

Kỹ thuật PFGE sử dụng các enzym giới hạn để cắt DNA nhiễm sắc thể hoặc plasmid thành những mảnh có kích thước lớn (50kb-12Mb), các mảnh DNA này sẽ được phân tách bằng điện di xung trường. So sánh mức độ đồng nhất của các băng DNA thu được để xác định mối liên quan về kiểu gen giữa các chủng vi khuẩn. Kỹ thuật PFGE được coi là một trong các tiêu chuẩn vàng để phân loại và xác định nguồn gốc của các loài vi khuẩn [96]. Tuy nhiên kỹ thuật này đòi hỏi phải có trang thiết bị đắt tiền, kỹ thuật phức tạp, giá thành đắt nên chỉ được thực hiện ở các đơn vị nghiên cứu chuyên sâu.

* Kỹ thuật phân tích plasmid

Phần lớn tính kháng kháng sinh của vi khuẩn đều được quy định bởi các gen nằm trên plasmid. Việc phân tích plasmid cho phép đánh giá khả năng lan truyền của các chủng vi khuẩn mang plasmid kháng kháng sinh. Trước đây việc phân tích plasmid dựa vào tính ổn định khi tiếp hợp hoặc Southern Blot [46, 124]. Tuy nhiên các phương pháp này tương đối phức tạp và không thể áp dụng để phân tích với số lượng mẫu lớn. Hiện nay rất nhiều tác giả phân loại plasmid mang gen kháng kháng sinh bằng kỹ thuật PCR xác định các bản sao của các loại plasmid được phát triển bởi Carattoli (2005) [38]. Đây là kỹ thuật đơn giản, dễ thực hiện để phân loại các plasmid mang gen kháng kháng sinh.

* Kỹ thuật Southern Blot

Kỹ thuật Southern Blot được thực hiện dựa trên nguyên lý sử dụng enzym S1 cắt các DNA mạch đơn của vi khuẩn và giữ lại plasmid. Sau khi điện di xung trường, các plasmid sẽ được chuyển sang màng lai và được lai với các mẫu dò đặc hiệu là các sản phẩm khuếch đại các gen kháng kháng sinh đã được đánh dấu. So sánh ảnh chụp gen của các plasmid trước lai và ảnh

plasmid sau lai sẽ đánh giá được các plasmid mang gen kháng kháng sinh cần tìm. Đây là kỹ thuật được áp dụng rộng rãi để phát hiện các plasmid mang gen kháng kháng sinh [33, 50].

*Kỹ thuật tiếp hợp

Tiếp hợp (conjugation) là hiện tượng truyền các vật liệu di truyền thường là các plasmid theo một chiều từ vi khuẩn cho đến vi khuẩn nhận thông qua hình thức tiếp xúc trực tiếp giữa các tế bào vi khuẩn trong cùng loài hoặc giữa các loài. Trong quá trình tiếp hợp các vi khuẩn tiếp xúc với nhau bằng pili sinh dục và các plasmid sẽ được chuyển từ tế bào cho sang tế bào nhận qua cầu nối pili đó bằng hình thức bơm đẩy. Đây là kỹ thuật đơn giản, dễ thực hiện, giá thành rẻ vì vậy 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 [54].

* Kỹ thuật giải trình tự nhiều locus (Multi Locus Sequence Typing-MLST)

Trong kỹ thuật MLST, các phản ứng PCR được dùng để khuếch đại các đoạn gen bảo tồn, sau đó tiến hành giải trình tự các đoạn gen đó. Kết quả giải trình tự được nhập lên ngân hàng gen để xác định dữ liệu về Allele của các đoạn gen bảo tồn trong nghiên cứu. So sánh kết quả về Allele để xác định ST (sequence type) của loại vi khuẩn trong nghiên cứu. So sánh các đoạn gen với các trình tự chuẩn của ngân hàng gen. Kỹ thuật MLST được đánh giá là tốt nhất để phân loại kiểu gen của nhiều loại vi khuẩn, và là một trong rất ít các kỹ thuật được dùng trong nghiên cứu dịch tễ học cho phép nhận biết được các chủng gây dịch, chủng kháng kháng sinh, đồng thời giám sát sự lan truyền của chúng trong phạm vi một quốc gia và trên toàn thế giới [67, 82, 86].

* Kỹ thuật giải trình tự gen

Giải trình tự gen là phương pháp chính xác nhất để xác định các đặc tính kháng kháng sinh của vi khuẩn. Thông qua quá trình giải trình tự gen, các

gen kháng kháng sinh, các đột biến liên quan đến tính kháng thuốc và các plasmid mang gen kháng kháng sinh được phát hiện. Hiện nay, với sự phát triển nhanh chóng của kỹ thuật giải trình tự gen, đã tạo ra các máy giải trình tự cho phép giải trình tự toàn bộ hệ gen của vi khuẩn một cách nhanh chóng. Đây là phương pháp chính xác và đưa lại nhiều thông tin nhất để nghiên cứu dịch tễ học cũng như các đặc tính sinh học phân tử, độc tố hay các đặc tính kháng kháng sinh của vi khuẩn [111].

Chương 2: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

2.1.1. Địa điểm nghiên cứu

a. Địa điểm thu thập mẫu

Huyện Vũ Thư nằm giữa ranh giới phía tây và nam của tỉnh Thái Bình với tỉnh Nam Định. Phía bắc và đông bắc lần lượt giáp các huyện Hưng Hà và Đông Hưng. Phía đông giáp thành phố Thái Bình và huyện Kiến Xương. Huyện có diện tích tự nhiên khoảng 195,1618 km² và dân số khoảng 227.921 người. Về hành chính huyện bao gồm 1 thị trấn Vũ Thư và 29 xã. Huyện Vũ Thư có cơ cấu kinh tế khá đa dạng. Tuy nhiên phần lớn dân số Vũ Thư làm nông nghiệp và làm trong các làng nghề tiểu thủ công nghiệp nên Vũ Thư có những đặc điểm kinh tế, xã hội khá điển hình của 1 huyện nông thôn ở Thái Bình. Hệ thống y tế của huyện có 1 bệnh viện đa khoa, 1 trung tâm y tế, 29 trạm y tế xã và thị trấn. Mạng lưới cung ứng thuốc có 1 hiệu thuốc bệnh viện, 29 đại lý thuốc tại các trạm y tế xã và thị trấn. Mạng lưới y tế tư nhân trên địa bàn huyện Vũ Thư có 121 quầy thuốc tư nhân

Tại huyện Vũ Thư đã chọn nghiên cứu tại xã Nguyên Xá, là xã cách thành phố Thái Bình khoảng 9km, có diện tích tự nhiên là 640 ha, phía đông giáp xã Song An, phía tây giáp với sông Hồng, phía nam giáp xã Vũ Tiến, phía bắc tiếp giáp xã Hòa Bình.

Dân số của xã 7730 người, 2008 hộ gia đình, số hộ y tế 1962. Hành chính xã được chia làm 4 thôn Ngô Xá, Kiến Xá, Thôn Thái và Hoàng Xá với 13 đội.

Nghề nghiệp chính của nhân dân trong xã là trồng trọt và chăn nuôi, có một số nhỏ là công nhân viên chức và buôn bán nhỏ. Nhìn chung, Nguyên Xá là một xã nghề nông phát triển với số lượng trang trại không nhiều, chủ yếu là các gia trại. Làng nghề truyền thống chủ yếu là nghề mộc ở ven đường giao

2.1.2. Thời gian nghiên cứu

Mục tiêu 1: Năm 2016 lấy mẫu phân tại cộng đồng và xét nghiệm tìm vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL.

Mục tiêu 2: Từ năm 2016 đến 2018: Phân tích các đặc điểm sinh học của các chủng *E. coli* sinh ESBL đã phân lập được

2.1.3. Đối tượng nghiên cứu

Mục tiêu 1: Mẫu phân của những người khỏe mạnh tại cộng đồng xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình.

Mục tiêu 2: Các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập được từ những người khỏe mạnh tại cộng đồng xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu được thiết kế theo phương pháp dịch tễ học mô tả qua 2 giai đoạn kế tiếp nhau và logic với nhau, quá trình lấy mẫu nghiên cứu của mục tiêu 1 đã thống nhất xuyên suốt để làm cơ sở thực hiện nghiên cứu tiếp theo cho mục tiêu 2, cụ thể như sau:

Mục tiêu 1: Được thiết kế theo phương pháp nghiên cứu dịch tễ học mô tả dựa trên cuộc điều tra cắt ngang qua lấy mẫu phân của những người khỏe mạnh tại 1 cộng đồng thuộc nông thôn ở huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình để xét nghiệm nhằm xác định sự lưu hành *E. coli* sinh ESBL ở người khỏe mạnh tại cộng đồng huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình.

Mục tiêu 2: Được thực hiện theo phương pháp nghiên cứu dịch tễ học mô tả qua phân tích mẫu tại phòng xét nghiệm để phân tích và đưa ra một số đặc điểm sinh học của các chủng *E. coli* sinh ESBL đã phân lập được.

2.2.2. Phương pháp chọn mẫu và tính cỡ mẫu

2.2.2.1. Phương pháp chọn mẫu

a. Phương pháp chọn địa điểm nghiên cứu

Tỉnh Thái Bình có 7 huyện (2 huyện ven biển, 5 huyện nội đồng) và 1 thành phố. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành bốc thăm ngẫu nhiên các huyện nội đồng và chọn được huyện Vũ Thư để thực hiện nghiên cứu.

Tiêu chuẩn chọn xã nghiên cứu: Xã nghiên cứu được lựa chọn dựa trên những đặc điểm cơ bản về kinh tế, văn hóa, xã hội, môi trường và sức khỏe đặc trưng của các xã thuộc vùng nông thôn Thái Bình với những tiêu chuẩn cụ thể như sau:

- Cách xa thành phố trên 5 km
- Phát triển cả nghề chăn nuôi và trồng trọt
- Có làng nghề truyền thống
- Trạm y tế xã đạt chuẩn quốc gia
- Xã vừa có cả quầy thuốc y tế vừa có quầy thuốc thú y
- Dân số từ 5 -10 triệu; tỷ lệ hộ nghèo < 5%.

Sau đó lập danh sách các xã ở huyện Vũ Thư có đủ tiêu chuẩn trên, bốc thăm chọn được xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư để thực hiện nghiên cứu.

Tại xã Nguyên Xá, lập danh sách các thôn trong xã rồi tiến hành bốc thăm ngẫu nhiên để chọn được một thôn là thôn Kiến Xá.

Lập danh sách các hộ gia đình trong thôn Kiến Xá rồi tiến hành bốc thăm ngẫu nhiên để chọn 60 hộ gia đình trong thôn vào tham gia nghiên cứu.

b. Phương pháp chọn mẫu

Đã áp dụng phương pháp chọn mẫu toàn bộ tại hộ gia đình, tiến hành lấy mẫu tất cả những người đang sống trong hộ gia đình đó.

+ Tiêu chuẩn loại trừ

Những người hiện tại đang phải điều trị các bệnh cấp tính.

Những người có tiền sử dùng kháng sinh trong vòng 3 tháng trước khi lấy mẫu.

2.2.2.2. Phương pháp tính cỡ mẫu

Cỡ mẫu xác định tỷ lệ nhiễm *E. coli* trong cộng đồng được áp dụng theo công thức:

$$n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{p(1-p)}{(p.\varepsilon)^2} \times k$$

- n: Cỡ mẫu nghiên cứu.
- $\alpha/2$: Độ tin cậy có ý nghĩa thống kê, trong nghiên cứu này lấy ở ngưỡng $\alpha = 0,05$; $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$.
- p: Ước tính tỷ lệ người khỏe mạnh nhiễm *E. coli* sinh ESBL qua một cuộc điều tra trước đó (trong nghiên cứu này lấy $p = 65\%$ là tỷ lệ có được qua nghiên cứu 2013 tại Thái Bình [5])
- ε : Hệ số sai số mong đợi của p, trong nghiên cứu này chúng tôi chọn $\varepsilon = 0,15$.
- k: Hệ số thiết kế khi chọn mẫu chùm, với $k = 2$.

Với các dữ liệu trên, cỡ mẫu được tính toán là 184 mẫu.

Nhằm đảm bảo cỡ mẫu nghiên cứu chúng tôi lập danh sách đối tượng thêm 20% so với cỡ mẫu. Trên thực tế chúng tôi thu thập được 212 mẫu phân của 212 người thuộc 59 hộ gia đình.

2.3. Các biến số và chỉ số nghiên cứu

- Đặc điểm của đối tượng nghiên cứu: Tuổi, giới, hộ gia đình, trình độ học vấn, nghề nghiệp.
- Tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL ở người khỏe mạnh trong cộng đồng theo tuổi, giới, hộ gia đình, trình độ học vấn, nghề nghiệp.
- Đặc điểm kháng kháng sinh của *E. coli* sinh ESBL: tỷ lệ kháng, số lượng kháng sinh bị kháng, tỷ lệ kháng đa thuốc.
- Đặc điểm các gen mã hóa sinh ESBL ở các chủng *E. coli* sinh ESBL: Tỷ lệ các gen mã hóa sinh CTX-M, TEM, SHV; kiểu gen; số lượng gen.

- Đặc điểm nhóm phát sinh loài ở các chủng *E. coli* sinh ESBL: Tỷ lệ xuất hiện các nhóm phát sinh loài (A, B1, B2, D).
- Đặc điểm các gen độc lực trong các chủng *E. coli* sinh ESBL: Tỷ lệ các loại gen độc lực, số lượng gen độc lực.
- Mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng *E. coli* sinh ESBL: Mức độ tương đồng DNA giữa các chủng.
- Đặc điểm plasmid của các chủng *E. coli* sinh ESBL: số lượng, tỷ lệ các loại plasmid, đặc điểm các plasmid mang gen mã hóa ESBL, khả năng lan truyền các plasmid mang gen mã hóa ESBL.

2.4. Vật liệu nghiên cứu

***Dụng cụ lấy mẫu phân**

Bộ dụng cụ lấy mẫu phân swab kit của hãng Eiken Chemical, Nhật Bản gồm 1 que lấy mẫu và 1 ống chứa dung dịch vận chuyển mẫu Cary-Blair.

***Vật liệu cho nuôi cấy, phân lập *E. coli* từ mẫu phân**

- *Hóa chất, sinh phẩm:*

- + Thạch MacConkey (Nissui, Nhật Bản)
- + Kháng sinh Cefotaxime (Tokyo Chemical Industry, Nhật Bản)

- *Máy móc, dụng cụ*

Que cấy nhựa, hộp lồng nhựa vô trùng đường kính 90 mm, tủ ẩm

Vật liệu cho định danh vi khuẩn *E. coli

- *Hóa chất, sinh phẩm:*

- + Môi trường Triple sugar/ iron agar (TSI), (OXOID, Anh).
- + Môi trường MIL-Lysine-Indole-Motility (LIM), (BD and BD, Mỹ)
- + Môi trường cellobiose - lactose- indole - β - d-glucuronidase agar (CLIG) (Kyokuto, Nhật Bản)

- *Máy móc, dụng cụ*

Que cấy nhựa, ống thủy tinh, tủ ẩm

*** Vật liệu cho xác định kiểu hình ESBL và đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng *E. coli***

- Hóa chất, sinh phẩm:

- + Môi trường Muller Hinton (OXOID, Anh)
- + Các loại khoanh giấy kháng sinh (OXOID, Anh) để xác định kiểu hình ESBL: cefotaxime (CTX), cefotaxim/acid clavulanic (CTX-C), ceftazidime (CAZ), ceftazidime/acid clavulanic (CAZ-C)
- + Các loại khoanh giấy kháng sinh (OXOID, Anh) để xác định đặc điểm kháng kháng sinh: Ampicillin (AMP), Fosfomycin (FOF), Cefoxitin (FOX), Ceftazidime (CAZ), Meropenem (MEM), Gentamicin (GEN), Kanamycin (KAN), Streptomycin (STR), Tetracycline (TET), Ciprofloxacin (CIP), Chloramphenicol (CHL), Nalidixic acid (NAL), Sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT).
- + NaCl 0,9%, McFarland 0,5
- + Chủng chuẩn quốc tế *Escherichia coli* ATCC 25922

- Máy móc, dụng cụ:

- + Que cấy, tăm bông, đèn cồn
- + Dụng cụ đặt khoanh giấy kháng sinh: Pince kẹp không có máu, máy dập khoanh giấy của hãng Becton Dickison - Đức.
- + Hộp lồng nhựa vô trùng đường kính 90mm, 150 mm, thước đo vòng ức chế
- + Tủ an toàn sinh học cấp 2, tủ âm

*** Vật liệu cho các phản ứng PCR, Realtime PCR**

- Hóa chất, sinh phẩm:

- + Trình tự các cặp mồi đặc hiệu cho các gen dùng cho phản ứng PCR được tham khảo từ các nghiên cứu đã công bố và được tổng hợp bởi Invitrogen (Singapore).
- + Bộ kit cho Multiplex PCR (Qiagen, Đức).

+ Bộ kit qPCR-Sybgreen (Qiagen) cho Realtime PCR.
 + Các chứng dương cho các phản ứng PCR được tổng hợp từ các chủng *E. coli* phân lập từ các mẫu thực phẩm và bệnh phẩm mang các gen tương ứng với các gen cần tìm cho phản ứng PCR. Các chứng dương này được tổng hợp và cung cấp bởi Viện Y tế công cộng phủ Osaka, Nhật Bản.

+ Thạch agarose (Sigma, Mỹ) dùng trong điện di gen
 + TBE buffer 10 X (Sigma, Mỹ)
 + GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X (Biotium)
 + Thang DNA chuẩn 100 bp (Invitrogen)

- *Máy móc, dụng cụ:*

+ Ống PCR (Eppendorf)
 + Máy ly tâm lạnh (Clinispin, Đức), máy spindown (Eppendorf, Đức)
 + Máy điều nhiệt tự động (Eppendorf, Đức)
 + Bộ điện di ngang (Fisher scientific, Mỹ)
 + Máy chụp ảnh gel (Biorad, Mỹ)
 + Máy Realtime PCR Light Cyclers 480 (Roche, Mỹ)

*** Vật liệu cho kỹ thuật PFGE**

- *Hóa chất, sinh phẩm:*

+ Enzyme XbaI (Sigma), proteinase K (Promega), Trypticase Soy Agar (Sigma), N-lauroyl sarcosine (Sigma), Agarose (Sigma), Seakem Gold Agarose (Lonza), TBE Buffer (Sigma), BSA (Sigma), GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), Tris-HCl (Sigma), EDTA (Sigma).

+ Chủng chuẩn *Braenderup H9812*

- *Máy móc, dụng cụ:*

+ Plug Mold (Biorad)
 + Dàn máy PFGE (CHEF - DRR II (Bio- rad))

*** Vật liệu cho kỹ thuật Southern Blot**

- *Hóa chất, sinh phẩm:*

- + Các sinh phẩm, hóa chất, dùng trong kỹ thuật PFGE
- + Enzym S1 (Của hãng Sigma)
- + Bộ sinh phẩm ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection SysTEMs (Amersham)
- + Sản phẩm khuếch đại các gen *bla TEM*, *blaCTX-M-1* và *blaCTX-M-9*
- + Chủng chuẩn *Braenderup H9812*
- + HCl, NaCl, NaOH

- *Máy móc, dụng cụ*

- + Máy móc dụng cụ cho phản ứng PFGE
- + Máy chuyển DNA lên màng lai (Prehybridization)
- + Máy Hybridization (UPV HL-2000 HybriLinker)

*** *Vật liệu cho kỹ thuật tiếp hợp***

- *Hóa chất, sinh phẩm*

- + Chủng *E. coli* J53AzR
- + Môi trường: Chrom Agar ECC (CHROMagar, Pháp), MacConkey (Nissui, Nhật Bản).
- + Sodium azide (NaN_3), cefotaxime
- + Các sinh phẩm cho phản ứng PCR xác định gen mã hóa sinh ESBL

- *Máy móc, dụng cụ*

- + Máy đo độ đục, máy móc và dụng cụ cho phản ứng PCR.

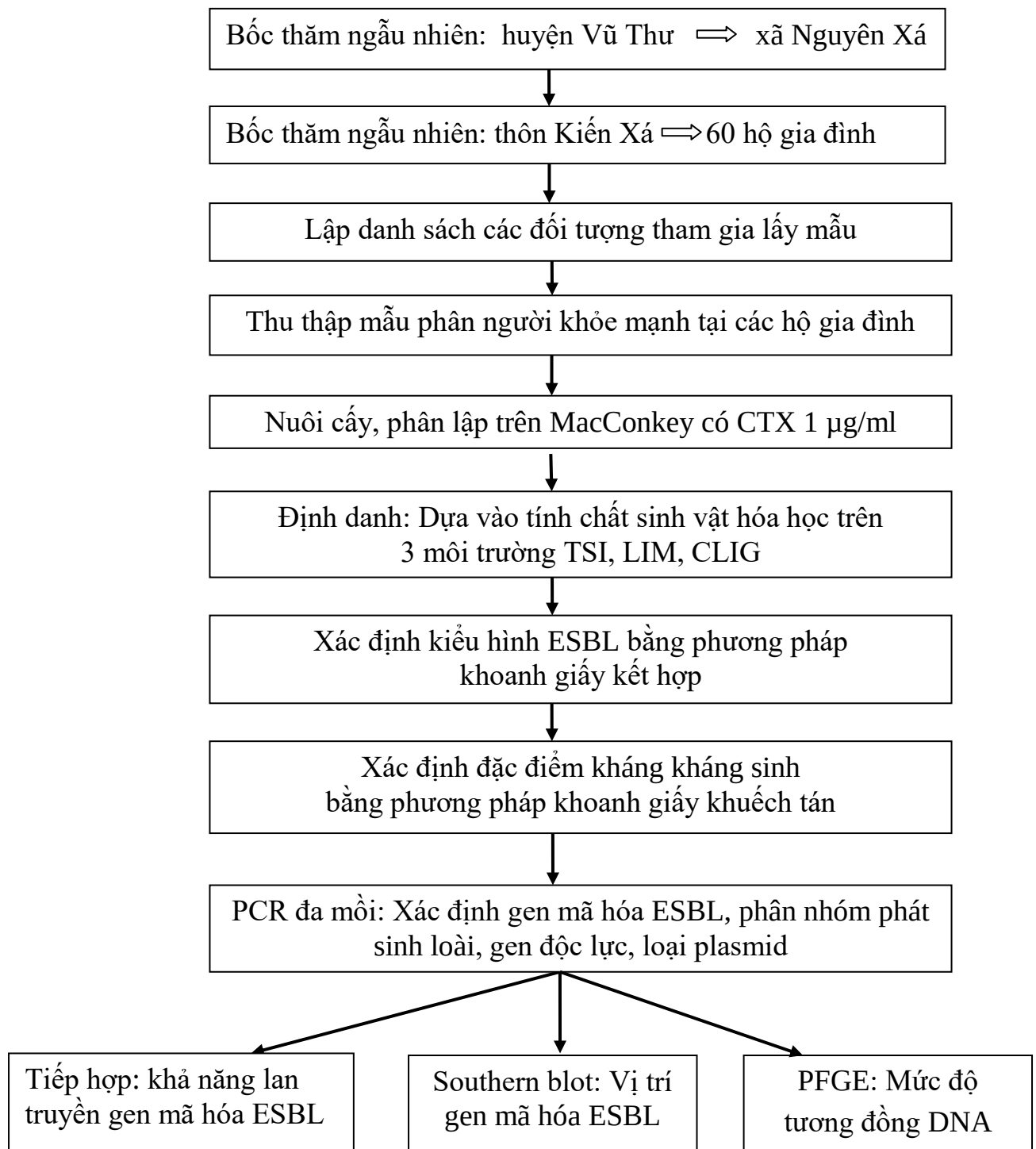
2.5. Các kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu

Đội ngũ cán bộ hợp tác trong nhóm nghiên cứu đã được đào tạo đầy đủ cùng với sự tham gia của các chuyên gia Nhật Bản đến từ Viện Y tế công cộng phủ Osaka.

Các kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu được thực hiện tại các phòng thí nghiệm chuẩn mực, cụ thể được tóm tắt trong bảng 2.1.

Bảng 2.1. Tên các kỹ thuật thực hiện trong nghiên cứu

STT	Kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu	Nơi thực hiện
1	Kỹ thuật lấy mẫu phân	Xã Nguyên Xá
2	Phân lập và định danh trực khuẩn <i>E. coli</i> từ mẫu phân dựa vào tính chất sinh vật hóa học	Trung tâm Dịch vụ KHKT Y Dược, Đại học Y Dược Thái Bình
3	Xác định các chủng <i>E. coli</i> mang kiểu hình ESBL bằng phương pháp khoanh giấy kết hợp	
4	Xác định đặc điểm kháng kháng sinh của <i>E. coli</i> ESBL bằng kỹ thuật khoanh giấy khuếch tán	
5	Xác định các gen mã hóa sinh ESBL của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL bằng kỹ thuật PCR đa môi	
6	Xác định gen mcr-1 kháng colistin của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL bằng kỹ thuật realtime PCR	
7	Xác định đặc điểm phân nhóm phát sinh loài của <i>E. coli</i> sinh ESBL bằng kỹ thuật PCR đa môi	
8	Xác định gen độc lực của <i>E. coli</i> sinh ESBL bằng kỹ thuật PCR đa môi	
9	Xác định các loại plasmid mang gen mã hóa gen sinh ESBL bằng kỹ thuật PCR đa môi	
10	Phân tích mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL bằng kỹ thuật PFGE	Viện Vệ sinh Dịch tễ TƯ
11	Xác định vị trí các gen mã hóa sinh ESBL bằng kỹ thuật Southern Blot	Viện Y tế công cộng phủ Osaka, Nhật Bản
12	Đánh giá khả năng lan truyền các gen mã hóa sinh ESBL của các chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL bằng hình thức tiếp hợp	Viện Vệ sinh Dịch tễ TƯ Trường Đại học Y Dược Thái Bình



Hình 2.2. Sơ đồ tóm tắt phương pháp thu thập thông tin nghiên cứu

2.5.1. Kỹ thuật lấy mẫu phân

Đối tượng nghiên cứu được hướng dẫn đầy đủ kỹ thuật lấy mẫu phân theo hướng dẫn của Bộ Y tế [3], sử dụng bộ dụng cụ lấy mẫu phân (swab kit,

Eiken Chemical, Japan) với quy trình cụ thể như sau:

Bước 1: Ngồi quay mặt ngược lại với vị trí thường ngồi khi đi vệ sinh

Bước 2: Dùng giấy vệ sinh lót toàn bộ phần lòng trong của bệ xí

Bước 3: Đi đại tiện

Bước 4: Xé túi, ghi tên mình lên ống lấy mẫu.

Bước 5: Dùng que lấy mẫu quét nhẹ lên bãi phân theo các chiều khác nhau. Lấy một lượng phân vừa đủ (khoảng 1g)

Bước 6: Mở nắp ống chứa dung dịch vận chuyển mẫu Cary-Blair đưa que lấy mẫu vào trong ống lấy mẫu, vặn chặt nắp và cho vào 1 túi riêng.

Tất cả các mẫu sau khi thu nhận được đánh mã số, đảm bảo cho quá trình truy xuất kết quả với lý lịch mẫu. Mẫu được bảo quản lạnh trong suốt quá trình vận chuyển về phòng thí nghiệm trường Đại học Y Dược Thái Bình và tiến hành nuôi cấy ngay trong ngày.

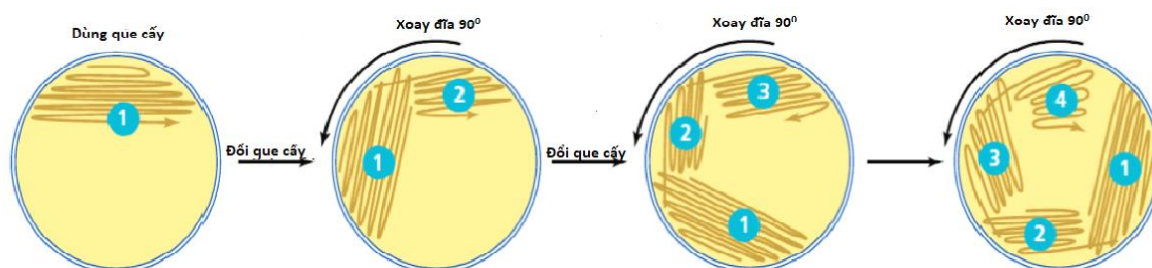
2.5.2. Kỹ thuật nuôi cấy, phân lập *E. coli* từ mẫu phân

a. Nguyên lý

Sử dụng thạch MacConkey có bổ sung cefotaxime 1 µg/ml để sàng lọc các vi khuẩn đường ruột có khả năng sinh ESBL [126].

b. Các bước tiến hành

Mẫu phân được cấy trực tiếp trên môi trường thạch MacConkey có bổ sung cefotaxime (CTX) với nồng độ 1 µg/ml theo phương pháp cấy phân vùng (như hình vẽ). Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C} / 24 \pm 3\text{h}$.



Hình 2.3. Cách cấy mẫu phân trên môi trường MacConkey

c. Nhận định kết quả

Nếu các đĩa có khuẩn lạc mọc chứng tỏ trong mẫu phân có vi khuẩn đường ruột kháng cefotaxime. Với mỗi mẫu phân, chọn 1 khuẩn lạc dạng *E. coli* (khuẩn lạc có màu đỏ hoặc hồng) đứng riêng rẽ để định danh xác định *E. coli*. Những đĩa không có khuẩn lạc mọc kết luận âm tính.

2.5.3. Kỹ thuật định danh vi khuẩn *E. coli*

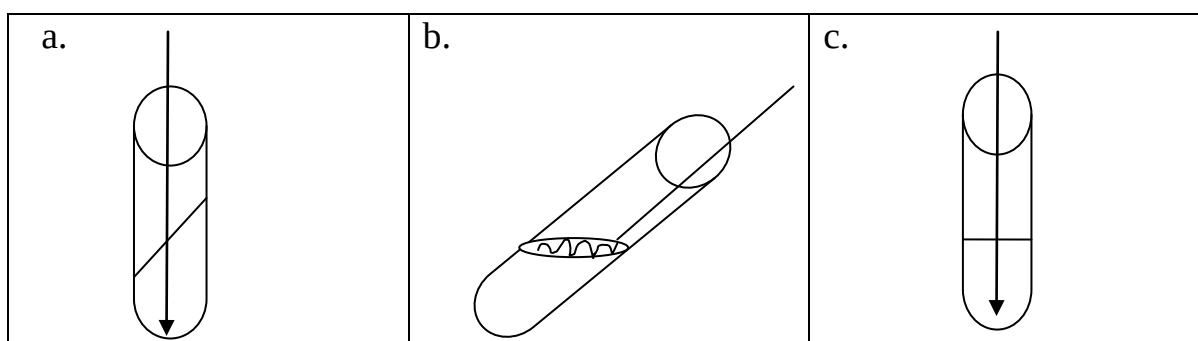
a. Nguyên lý:

Dựa vào một số đặc điểm sinh vật, hóa học điển hình của *E. coli* như: Lên men glucose (+), không sinh H_2S , sinh Indol (+), lên men cellobiose (-), thủy phân β -glucuronidase (+) để định danh *E. coli* sử dụng 3 ống môi trường TSI, LIM và CLIG dựa theo hướng dẫn của hiệp hội vi sinh Mỹ [70].

b. Các bước tiến hành

Dùng que cấy chạm vào phần phòng nhất của bề mặt khuẩn lạc đã chọn rồi cấy lần lượt vào 3 môi trường theo thứ tự: TSI, LIM và CLIG như sau:

- Trên môi trường thạch nghiêng TSI và CLIG: Cắm đầu que cấy vào chính giữa và sâu xuống đáy ống chứa môi trường, sau đó rút que cấy lên và cấy lên bề mặt nghiêng của mặt thạch theo đường dích dắc (như hình 2.3 a, b). Ủ ở $37^\circ C$ trong 18h - 24h.



Hình 2.4. Cách cấy khuẩn lạc trên TSI, CLIG: phần đứng (a), phần nghiêng (b); trên LIM (c)

- Trên môi trường thạch đứng (LIM): Cắm đầu que cấy vào chính giữa, sâu xuống khoảng mặt thạch, cách đáy ống khoảng 5 -10 mm (như hình 2.3c). Ủ ở $37^\circ C$ trong 18h - 24h.

c. Nhận định kết quả

Xác định vi khuẩn *E. coli* dựa vào bảng tiêu chuẩn chẩn đoán *E. coli* theo hướng dẫn của hội vi sinh Mỹ như sau:

Bảng 2.2. Tiêu chuẩn chẩn đoán *E. coli* [70]

Môi trường	Tính chất	<i>E. coli</i>
TSI	Lên men glucose	Có
	Lên men lactose/sucrose	Có
	Sinh gas	Có
	Sinh H ₂ S	Không
LIM	Khả năng decarboxylation Lysine	11- 89%
	Sinh Indol	90-100%
	Di động	11- 89%
CLIG	Lên men lactose	Có
	Lên men cellobiose	Không
	Thủy phân β - glucuronidase (UV)	90-100%

Việc chẩn đoán *E. coli* chủ yếu dựa vào các tính chất: Lên men glucose (+), sản xuất H₂S (-), sinh Indol (+), lên men cellobiose (-), thủy phân β -glucuronidase (+). Trong trường hợp các tính chất sinh vật hóa học không diễn hình trên 3 môi trường trên, thì các chủng nghi ngờ *E. coli* sẽ được định danh bộ kit API 20E (Biomérieux, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.5.4. Kỹ thuật xác định kiểu hình ESBL của các chủng *E. coli*

a. Nguyên lý

Xác định kiểu hình ESBL của các chủng *E. coli* bằng phương pháp khoan giấy kết hợp. Thử nghiệm xác nhận được thực hiện trên nguyên tắc tìm tác dụng hiệp lực giữa đĩa ceftazidime 30 μ g (CAZ) và ceftazidime/acid clavulanic 30/10 μ g (CAZ-C) hoặc (CTX-C). Sự kết hợp với chất ức chế ESBL

nư acid clavulanic sẽ làm tăng hoạt tính của cephalosporin thể hiện bằng sự giãn rộng của vùng kháng khuẩn. Khi đường kính vòng kháng khuẩn của đĩa cephalosporin/acid clavulanic $\geq 5\text{mm}$ so với đường kính vòng kháng khuẩn của đĩa cephalosporin thì chủng đó được xác định là mang kiểu hình ESBL [43].

b. Cách tiến hành

- Lấy các khuẩn lạc của các chủng *E. coli* đã được phân lập, thuần khiết trên môi trường TSA hòa với dung dịch NaCl 0,9%, so sánh độ đục của huyền dịch với độ đục của chuẩn McFarland 0,5 để có huyền dịch vi khuẩn ban đầu tương ứng 10^8 CFU/ml.
- Dàn huyền dịch vi khuẩn lên bề mặt thạch Muller Hinton (MH) bằng tấm bông vô trùng, để khô tự nhiên.
- Đặt khoanh giấy kháng sinh: Đặt 4 khoanh giấy kháng sinh (CTX, CTX-C, CAZ và CAZ-C trên một đĩa thạch MH bằng máy dập khoanh giấy sao cho khoảng cách giữa các khoanh giấy cách nhau 2 cm và cách mép đĩa 2 cm.
- Nuôi cấy: 37°C trong 18-24 giờ.
- Tất cả các bước trên thực hiện song song với chủng chuẩn quốc tế *Escherichia coli* ATCC 25922 để kiểm tra chất lượng của qui trình.

c. Nhận định kết quả

Đo và ghi lại kích thước vòng vô khuẩn của chủng chuẩn. So sánh kết quả của chủng chuẩn với chuẩn giới hạn đối với chủng quốc tế *E. coli* ATCC 25922. Nếu kết quả nằm trong chuẩn giới hạn nghĩa là qui trình thực hiện đúng, tiếp tục đọc kết quả vòng vô khuẩn của chủng thử nghiệm, tính hiệu số giữa đường kính vòng vô khuẩn của CTX-C và CTX; CAZ-C và CAZ. Kết luận chủng *E. coli* mang kiểu hình ESBL nếu ít nhất một hiệu số trên $\geq 5\text{ mm}$.

Nếu kết quả không nằm trong chuẩn giới hạn, qui trình thực hiện chưa đúng hoặc hóa chất sinh phẩm hỏng, cần phải tiến hành lại thử nghiệm.

2.5.5. Kỹ thuật xác định đặc điểm kháng kháng sinh của *E. coli* sinh ESBL

a. Nguyên lý

Sử dụng phương pháp khoan giấy khuếch tán. Các khoan giấy có tâm kháng sinh được đặt lên đĩa thạch Muller Hilton, kháng sinh sẽ khuếch tán từ khoan giấy ra môi trường thạch xung quanh. Nếu vi khuẩn nhạy cảm với kháng sinh đó thì nó sẽ không mọc xung quanh khoan giấy. Đo đường kính vòng vô khuẩn và đọc mức độ kháng kháng sinh theo các mức: nhạy cảm (S); kháng (R); trung gian (I) dựa vào hướng dẫn của CLSI (M100-S25) [43]. Thử nghiệm được tiến hành với 13 loại kháng sinh theo hướng dẫn của CLSI [43].

b. Cách tiến hành:

Được thực hiện theo hướng dẫn của CLSI (M02-A11) [42] như sau:

- Chuẩn bị huyền dịch của các chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL trong NaCl 0,9 % tương ứng với độ đục chuẩn 0,5 McFarland.
- Trải đều huyền dịch lên đĩa thạch MH bằng tăm bông vô trùng, để ở nhiệt độ phòng trong 15 phút
- Đặt khoan giấy kháng sinh bằng máy đặt khoan giấy kháng sinh
- Để các đĩa thạch ở nhiệt độ phòng trong 15 phút cho kháng sinh từ các khoan giấy khuếch tán trên mặt thạch. Ủ ấm ở 37⁰C trong vòng 18-24 giờ.
- Tất cả các bước trên thực hiện song song với chủng chuẩn Quốc tế *Escherichia coli* ATCC 25922 để kiểm tra chất lượng của qui trình.

c. Nhận định kết quả

Đo và ghi lại kích thước vòng vô khuẩn của chủng chuẩn. So sánh kết quả của chủng chuẩn với chuẩn giới hạn đối với chủng quốc tế *E. coli* ATCC 25922. Nếu kết quả nằm trong chuẩn giới hạn nghĩa là qui trình thực hiện đúng, tiếp tục đọc kết quả vòng vô khuẩn của chủng thử nghiệm. Nếu kết quả không nằm trong chuẩn giới hạn, qui trình thực hiện chưa đúng hoặc hóa chất sinh phẩm hỏng, cần phải tiến hành lại thử nghiệm.

So sánh kích thước vòng vô khuẩn của chủng thử nghiệm với tiêu chuẩn đọc kết quả đường kính vùng ức chế đối với vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* của một số loại kháng sinh thử nghiệm theo tiêu chuẩn của CLSI (M100-S25) [43], cụ thể tiêu chuẩn này được thể hiện ở bảng 2.3

Bảng 2.3. Đường kính vùng ức chế đối với vi khuẩn thuộc họ *Enterobacteriaceae* của một số loại kháng sinh [43]

Tên kháng sinh	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)		
	Nhạy cảm (S)	Trung gian (I)	Kháng (R)
Ampicillin (AMP)	≥ 17	14-16	≤ 13
Ceftazidime (CAZ)	≥ 21	18-20	≤ 17
Cefoxitin (FOX)	≥ 18	15-17	≤ 14
Meropenem (MEM)	≥ 23	20-22	≤ 19
Streptomycin (STR)	≥ 15	12-14	≤ 11
Kanamycin (KAN)	≥ 18	14-17	≤ 13
Gentamicin (GEN)	≥ 15	13-14	≤ 12
Ciprofloxacin (CIP)	≥ 21	16-20	≤ 15
Nalidixic acid (NAL)	≥ 19	14-18	≤ 13
CIP Tetracycline (TET)	≥ 15	12-14	≤ 11
Chloramphenicol (CHL)	≥ 18	13-17	≤ 12
Sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT)	≥ 16	11-15	≤ 10
Fosfomycin (FOF)	≥ 16	13-15	≤ 12

Sau đó ghi lại kết quả của từng loại kháng sinh được thử nghiệm với các mức độ: nhạy cảm (S), trung gian (I) và kháng (R).

2.5.6. Kỹ thuật xác định gen mã hóa sinh ESBL của *E. coli* sinh ESBL

a. Nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật PCR đa môi để phát hiện sự lưu hành các gen mã hóa sinh ESBL thuộc nhóm *blaCTX-M* (gồm *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-2*, *blaCTX-M-8/25*, *blaCTX-M-9*); nhóm *blaTEM* và *blaSHV* dựa trên các cặp môi được thiết kế đặc hiệu cho các vùng gen dựa theo nghiên cứu của Lê Quốc Phong [102] với trình tự như sau:

Bảng 2.4. Trình tự môi cho phản ứng PCR xác định các gen mã hóa sinh ESBL

Gen	Tên môi	Trình tự (5' - 3')
<i>blaTEM</i> (372bp)	<i>TEM-410F</i>	GGTCGCCGCATACACTATTCTC
	<i>TEM-781R</i>	TTTATCCGCCTCCATCCAGTC
<i>blaSHV</i> (231bp)	<i>SHV-287F</i>	CCAGCAGGATCTGGTGGACTAC
	<i>SHV-517R</i>	CCGGGAAGCGCCTCAT
<i>blaCTX-M-1</i> (588bp)	ctxm1-115F	GAATTAGAGCGGCAGTCGGG
	ctxm1-702R	CACAACCCAGGAAGCAGGC
<i>blaCTX-M-2</i> (107bp)	ctxm2-39F	GATGGCGACGCTACCCC
	ctxm2-145R	CAAGCCGACCTCCCGAAC
<i>blaCTX-M-9</i> (475bp)	ctxm9-16F	GTGCAACGGATGATGTTCGC
	ctxm9-490R	GAAACGTCTCATCGCCGATC
<i>blaCTX-M-8/25</i> (186bp)	ctxm8g25g-533F	GCGACCCGCGCGATAC
	ctxm8g25g-718R	TGCCGGTTTTATCCCCG

b. Cách tiến hành

- Tách chiết DNA: DNA của vi khuẩn được tách chiết bằng phương pháp nhiệt: Lấy một số khuẩn lạc *E. coli* thuần khiết từ môi trường MH cho vào 100 µl TE, đun sôi cách thủy ở 95°C/ 10 phút, ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút, dịch nổi thu được dùng để làm DNA khuôn mẫu cho phản ứng PCR.

- Thực hiện phản ứng PCR:

Thành phần tham gia phản ứng PCR bao gồm: Hỗn hợp cho PCR đa môi (2X) (7,5 µl), dung dịch Q (1,5 µl), thuốc nhuộm CoralLoad (1,5 µl), hỗn hợp môi (0,6 µl), nước khử ion (3,4 µl), DNA (0,5 µl). Tổng thể tích cho phản ứng là 15 µl.

Chu trình nhiệt: 95°C trong 5 phút'; 25 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 60°C trong 90 giây, 72°C trong 90 giây); 68°C trong 10 phút.

Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 2% trong đệm TBE 0,5 X ở 120 V trong 60 phút, đọc kết quả bằng máy chụp gel Gel-Doc (Biorad).

- Tất cả các bước được thực hiện đồng thời với chứng âm và chứng dương

c. Nhận định kết quả

Xác định sự xuất hiện các gen của các mẫu thử bằng việc so sánh các băng của mẫu thử với các băng của mẫu chứng dương và thang chuẩn.

2.5.7. **Kỹ thuật xác định gen *mcr-1* kháng colistin của *E. coli* sinh ESBL**

a. Nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật realtime PCR để xác định sự xuất hiện gen *mcr-1* kháng colistin của các chủng *E. coli* sinh ESBL dựa trên cặp môi được thiết kế đặc hiệu dựa theo nghiên cứu của Bontron [31] với trình tự cụ thể như sau:

Bảng 2.5. Trình tự môi cho phản ứng Realtime xác định gen *mcr-1*

Gen	Tên môi	Trình tự (5' - 3')
<i>mcr-1</i> (120bp)	mcr-1-qF1	ACACTTATGGCACGGTCTATG
	mcr-1-qR1	GCACACCCAAACCAATGATAC
16S rRNA (350bp) (chứng nội)	universal 27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	universal 338R	GCTGCCTCCCGTAGGAGT

b. Cách tiến hành

Thành phần tham gia phản ứng Realtime PCR bao gồm: 2X qPCR-

Sybgreen Mix (7,5 µl), môi cho *mcr-1* (0,6 µl), môi cho chứng nội (0,6 µl), nước khử ion (5,3 µl), DNA (1 µl). Tổng thể tích cho phản ứng là 15 µl.

Chu trình nhiệt: 95°C trong 2 phút'; 25 chu kỳ (95°C trong 5 giây, 60°C trong 25 giây, 72°C trong 5 giây); tiếp đó chu trình melting (95°C: 5 giây, 60°C: 10 phút, 95°C).

c. Nhận định kết quả

Kết quả của phản ứng được nhận biết bằng đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang. Nếu mẫu chứng dương có đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang rõ ràng với 2 đỉnh tại nhiệt độ 83°C (đỉnh của gen *mcr-1*) và nhiệt độ 88°C (đỉnh của chứng nội kiểm), mẫu chứng âm không xuất hiện đỉnh nào thì kết quả phản ứng đạt yêu cầu. Tiếp tục đánh giá kết quả các mẫu thử dựa vào đường biểu diễn huỳnh quang. Nếu mẫu có đường biểu diễn huỳnh quang với 2 đỉnh tương tự như chứng dương thì kết luận là mẫu dương tính với *mcr-1*, nếu đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang chỉ xuất hiện tại 1 đỉnh (ở nhiệt độ 88°C) thì kết luận mẫu âm tính với *mcr-1*. Nếu mẫu thử không xuất hiện đỉnh nào, nghi ngờ có chất ức chế, đề nghị lấy lại mẫu để thực hiện xét nghiệm.

2.5.8. Kỹ thuật xác định đặc điểm phân nhóm phát sinh loài của các chủng *E. coli* sinh ESBL

a. Nguyên lý

Sử dụng kỹ thuật PCR đa môi dựa trên 3 gen chỉ thị đó *chuA*, *yjaA* và *TspE4C2* để xác định đặc điểm 4 nhóm phát sinh loài chính của vi khuẩn *E. coli* là A, B1, B2 và D với trình tự môi đặc hiệu cho các gen được thiết kế theo nghiên cứu của Clemont năm 2000 [41], với trình tự môi cụ thể được thể hiện trong bảng 2.6.

Bảng 2.6. Trình tự môi cho phản ứng PCR đa môi xác định nhóm phát sinh loài

Gen	Tên môi	Trình tự (5' - 3')
<i>ChuA</i> (279 bp)	ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT
	ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA
<i>YjaA</i> (211bp)	YjaA.1	TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG
	YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC
<i>TspE4C2</i> (152 bp)	TspE4C2.1	GAGTAATGTCGGGGGCATTCA
	TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG

b. Cách tiến hành

Thành phần phản ứng PCR: Hỗn hợp cho PCR đa môi (2X) (7,5 µl), dung dịch Q (1,5 µl), thuốc nhuộm CoralLoad (1,5 µl), hỗn hợp môi (0,3 µl), nước khử ion (3,7 µl), DNA (0,5 µl). Tổng thể tích cho phản ứng là 15 µl.

Chu trình nhiệt: 95°C trong 5 phút'; 25 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 57°C trong 90 giây, 72°C trong 30 giây); 68°C trong 10 phút.

Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 2% trong đệm TBE 0,5X ở 120 V trong 60 phút, đọc kết quả bằng máy chụp gel Gel-Doc.

c. Nhận định kết quả

Đánh giá sự có mặt của các gen *chuA*, *YjaA* và *TspE4C2* trong các mẫu thử dựa vào so sánh với các băng trong mẫu chứng dương và thang DNA chuẩn. Xếp loại phân nhóm phát sinh loài dựa vào sự xuất hiện của các gen *ChuA*, *YjaA* và *TspE4C2* theo bảng sau:

Bảng 2.7. Phân nhóm phát sinh loài dựa vào các gen *chuA*, *yjaA*, và *TspE4C2*

Nhóm Gen	Phân nhóm phát sinh loài của <i>E. coli</i> dựa vào các gen			
	A	B1	B2	D
<i>ChuA</i>	(-)	(-)	(+)	(+)
<i>YjaA</i>	(+)	(+) hoặc (-)	(+)	(-)
<i>TspE4C2</i>	(-)	(+)	(+) hoặc (-)	(+) hoặc (-)

2.5.9. Kỹ thuật xác định gen độc lực của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL

a. Nguyên lý: Sử dụng 2 phản ứng PCR đa môi và 1 phản ứng PCR để phát hiện 11 gen độc lực đại diện cho 6 nhóm *E. coli* gây tiêu chảy, bao gồm: *stx1* và *stx2* (nhóm EHEC), *lt*, *stIa/stIb* (nhóm ETEC), *eaeA*, *bfpA* (nhóm EPEC), *daaD* (nhóm DAEC), *ipaH* (nhóm EIEC), *aggR*, *astA* (nhóm EAEC) với trình tự mỗi đặc hiệu cho các gen được thiết kế dựa theo nghiên cứu của Guion và Hynenoya [53, 60], có trình tự cụ thể như sau

Bảng 2.8. Trình tự môi cho phản ứng PCR xác định các gen độc lực

Gen	Tên môi	Trình tự (5' - 3')
<i>eaeA</i> (248 bp)	eaeA-F	ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG
	eaeA-R	GCCTTCATCATTTTCGCTTTC
<i>aggR</i> (100 bp)	agg-F	CGAAAAAGAGATTATAAAAATTAAC
	agg-R	GCTTCCTTCTTTTGTGTAT
<i>daaD</i> (444 bp)	daaD-F	TGAACGGGAGTATAAGGAAGATG
	daaD-R	GTCCGCCATCACATCAAAA
<i>ipaH</i> (619 bp)	ipaH-F	GTTCTTGACCGCCTTTCGATACCGTC
	ipaH-R	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC
<i>st</i> (159-138bp)	stIa-F	TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAA
	stIb-F	TGCTAAACCAGTAGAGTCTTCAAAA
	st-R	GCAGGATTACAACACAATTCACAGCAG
<i>bfpA</i> (324 bp)	bfpA-F	AATGGTGCTTGCTTGCGCTTGCTGC
	bfpA-R	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA
<i>stx1</i> (150 bp)	stx1-F	CTGGATTTAATGTCGCATAGTG
	stx1-R	AGAACGCCCACTGAGATCATC
<i>stx2</i> (255 bp)	stx2-F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC
	stx2-R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG
<i>lt</i> (322 bp)	lt-F	TCTCTATGTGCATACGGAGC
	lt-R	CCATACTGATTGCCGCAAT
<i>AstA</i> (94 bp)	AstA-F	CACAGTATATCCGAAGGC
	Ast A-R	CGAGTGACGGCTTTGTAG

b. Cách tiến hành

Thực hiện 3 phản ứng PCR để xác định các gen độc lực

- Phản ứng 1: Xác định các gen *eaeA*, *aggR*, *daaD*, *ipaH*, *St*, *bfpA*
- Phản ứng 2: Xác định các gen *stx1*, *stx2*, *lt*
- Phản ứng 3: Xác định gen *AstA*

Thành phần tham gia phản ứng PCR bao gồm: Hỗn hợp cho PCR đa mồi (2X) (7,5 µl), thuốc nhuộm CoralLoad (1,5 µl), hỗn hợp mồi (0,6 µl), nước khử ion (4,9 µl), DNA (0,5 µl). Tổng thể tích cho phản ứng là 15 µl.

Chu trình nhiệt: 95°C trong 5 phút'; 35 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 57°C trong 90 giây, 72°C trong 30 giây); 68°C trong 10 phút.

Điện di sản phẩm PCR trên thạch agarose 2% trong TBE 0,5 X ở 120 V trong 60 phút. Đọc kết quả trên máy chụp gel Gel-Doc.

c. Nhận định kết quả

Xác định sự có mặt của các gen độc lực bằng việc so với các băng của chứng dương và thang chuẩn DNA.

2.5.10. Phân tích mối liên hệ kiểu gen bằng kỹ thuật PFGE

a. Nguyên lý

Kỹ thuật PFGE dùng để so sánh mức độ tương đồng DNA giữa các chủng vi khuẩn. Kỹ thuật này dựa vào sự phân cắt các DNA của vi khuẩn bằng enzyme giới hạn có rất ít điểm cắt để tạo ra được các mảnh DNA có kích thước lớn. Các mảnh này được tách bằng kỹ thuật PFGE và điện di trên thạch agarose. Đánh giá mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng dựa vào so sánh mức độ đồng nhất của các băng DNA thu được [105].

b. Các bước tiến hành

Được tiến hành theo quy trình chuẩn dành cho *E. coli* của PulseNet [105] bao gồm một số bước sau:

- Ngày 1: Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường TSA-SB (Trypticase Soy Agar có 5% máu cừu đã khử fibrin) ở 37°C trong 14 -18 giờ.

- Ngày 2: Chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn trong dung dịch đệm (100mM Tris: 100mM EDTA, pH 8.0).

Xử lý huyền dịch vi khuẩn bằng protein K, sau đó trộn với SeaKem Gold agarose 1% trong đệm TE ở dạng tan và giữ ở 55 - 60°C. Ngay sau đó hỗn dịch được chia vào các giếng PFGE đã chuẩn bị sao cho không tạo bọt. Để các giếng ở nhiệt độ phòng trong 10 -15 phút hoặc để 4°C trong 5 phút.

Ly giải tế bào trong các giếng: các giếng gel có chứa xác vi khuẩn được xử lý với dung dịch ly giải vi khuẩn (50 mM Tris: 50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosyl) và proteinase K, ủ lắc các tube chứa hỗn dịch ở 54-55°C trong 1,5-2 giờ với tốc độ lắc 150-175 vòng/phút.

Rửa các giếng sau khi ly giải tế bào: Hỗn dịch các tế bào đã bị ly giải được rửa ít nhất 2 lần bằng nước cất (mỗi lần rửa ngâm và lắc ở 54 -55°C trong 15 phút). Sau đó được rửa 4 lần bằng đệm TE.

Phân cắt DNA bằng enzyme giới hạn: hỗn dịch chứa DNA này được phân cắt bằng enzyme cắt giới hạn XbaI qua đêm ở 37°C.

- Ngày 3: Mẫu DNA sau khi được phân cắt bằng enzym giới hạn được điện di trên agarose 1% (Seakem Gold) bằng hệ thống CHEF-DR II (Bio-Rad) ở hiệu điện thế 6V/cm trong 19 giờ ở nhiệt độ 140°C thời gian một xung từ 25 đến 60s và góc điện trường là 120 độ. Nhuộm gel trong dung dịch ethidium bromide và chụp ảnh để xác định số lượng và kích thước plasmid của các chủng vi khuẩn.

c. Nhận định kết quả

Sử dụng phần mềm Bionumeric 6.6 để tạo cây phả hệ và xác định mức độ tương đồng gen giữa các chủng *E. coli* sinh ESBL dựa trên tiêu chuẩn của Tenover (1995) [114] với các cấp độ về mức độ tương đồng gen của các chủng vi khuẩn như sau:

- Không thể phân biệt được (không có sự khác biệt, Indistinguishable):

thể hiện số vạch trên gel như nhau và kích thước các vạch tương tự nhau. Đây có thể là cùng 1 chủng gây bệnh và là chủng đại diện cho ổ dịch. Những chủng này cũng có thể không phân biệt được bằng các phương pháp khác.

- Quan hệ rất gần (closely related): những chủng có sự khác biệt rất nhỏ chỉ với 1 yếu tố di truyền phân tử như 1 điểm đột biến, mất đi hoặc chèn thêm vào 1 đoạn DNA. Khi phân tích PFGE, các chủng này thể hiện sự sai khác ở 2-3 vạch. Những chủng này có thể là những chủng tham gia gây nên ổ dịch và có đặc điểm dịch tễ của bệnh tương đối giống nhau.

- Có thể có quan hệ (possibly related): gồm những chủng có 2 điểm khác biệt về di truyền phân tử độc lập, thể hiện có trên gel là có 4-6 vạch khác nhau. Những chủng này có rất ít đặc điểm về dịch tễ với nhau như xa về vùng địa lý, đặc điểm khí hậu.

- Không có quan hệ: có ít nhất 3 yếu tố di truyền phân tử độc lập khác nhau, thể hiện có ít nhất 7 vạch khác nhau. Các chủng này không có quan hệ với nhau về đặc điểm dịch tễ của bệnh cũng như khả năng gây bệnh.

Các chủng vi khuẩn được xếp vào các nhóm không thể phân biệt, quan hệ rất gần và có thể có quan hệ thường có mức độ tương đồng trên 80%.

2.5.11. Kỹ thuật xác định các loại plasmid của các chủng *E. coli* sinh ESBL

a. Nguyên lý

Dựa vào 3 phản ứng PCR đa môi xác định sự xuất hiện của 20 loại plasmid phổ biến ở *E. coli* trên các chủng *E. coli* sinh ESBL. Trình tự môi được thiết kế đặc hiệu cho các replicon của plasmid dựa theo nghiên cứu của Carattoli và cộng sự (2005) [38] như bảng 2.9. Việc phân nhóm các plasmid trong 3 phản ứng multiplex PCR được thực hiện dựa theo nghiên cứu của Johnson năm 2007 [69].

Bảng 2.9. Trình tự các cặp mồi cho phản ứng PCR xác định các plasmid

Gen	Tên mồi	Trình tự (5' - 3')
<i>B/O</i> (159bp)	B/O-F	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC
	B/O-R	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA
<i>FIC</i> (260bp)	FIC-F	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG
	FIC-R	TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT
<i>A/C</i> (465 bp)	A/C-F	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA
	A/C-R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT
<i>P</i> (534 bp)	P-F	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA
	P-R	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC
<i>T</i> (750bp)	T-F	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT
	T-R	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC
<i>W</i> (242bp)	W-F	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG
	W-R	GGTGCGCGGCATAGAACCGT
<i>FIIA</i> (270bp)	FIIA-F	CTGTCGTAAGCTGATGGC
	FIIA-R	CTCTGCCACAACTTCAGC
<i>FIA</i> (462bp)	FIA-F	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG
	FIA-R	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG
<i>FIB</i> (702 bp)	FIB-F	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG
	FIB-R	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT
<i>Y</i> (765bp)	Y-F	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG
	Y-R	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT
<i>K/B</i> (160 bp)	K/B-F	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC
	K/B-R	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA
<i>I1</i> (139bp)	I1-F	CGAAAGCCGGACGGCAGAA
	I1-R	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT
<i>Frep</i> (270bp)	Frep-F	TGATCGTTTAAGGAATTTTG
	Frep -R	GAAGATCAGTCACACCATCC
<i>X</i> (376 bp)	X-F	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT
	X-R	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC

Bảng 2.9 (tiếp)

Gen	Tên môi	Trình tự (5' - 3')
<i>HI1</i> (471bp)	HI1-F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC
	HI1-R	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA
<i>N</i> (559bp)	N-F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG
	N-R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC
<i>HI2</i> (644bp)	HI2-F	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC
	HI2-R	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT
<i>L/M</i> (785bp)	L/M-F	GGATGAAAACCTATCAGCATCTGAAG
	L/M-R	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG

b. Cách tiến hành phản ứng Multiplex PCR

- Phản ứng 1: Xác định các plasmid B/O, FIC, A/C, P, T
- Phản ứng 2: Xác định các plasmid W, FIIA, FIA, FIB, Y, K/B
- Phản ứng 3: Xác định các plasmid I1, Frep, X, HI1, N, HI2, L/M

Thành phần tham gia phản ứng PCR bao gồm: Hỗn hợp cho PCR đa môi (2X) (7,5 µl), thuốc nhuộm CoralLoad (1,5 µl), hỗn hợp môi (0,6 µl), nước khử ion (4,9µl), DNA (0,5 µl). Tổng thể tích cho phản ứng là 15 µl.

Chu trình nhiệt: 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 60°C trong 90 giây, 72°C trong 30 giây); 68°C trong 10 phút.

Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 2% trong dung dịch đệm TBE 0,5 X ở 120 V trong 60 phút. Đọc kết quả bằng máy chụp gel Gel-Doc (Biorad).

c. Nhận định kết quả

Xác định sự có mặt của các plasmid bằng cách so sánh các băng của các mẫu trên agarose gel với các băng của chứng dương và thang DNA chuẩn trong cùng phản ứng PCR.

2.5.12. Xác định vị trí các gen mã hóa sinh ESBL bằng phương pháp Southern Blot

a. Nguyên lý

Phương pháp lai Southern Blot là phương pháp lai giữa DNA của tế bào với mẫu dò DNA. Phương pháp này cho phép nghiên cứu DNA của bộ gen, kiểm tra kết quả chuyển gen hoặc kiểm tra sự có mặt của một gen nào đó trong bộ gen của tế bào [33].

Việc xác định vị trí các gen mã hóa sinh ESBL nằm trên nhiễm sắc thể hay plasmid và kích thước của các plasmid mang các gen mã hóa sinh ESBL được thực hiện bằng phương pháp Southern Blot sử dụng mẫu dò là các sản phẩm khuếch đại gen *blaTEM*, *blaCTX-M-1* và *blaCTX-M-9* được đánh dấu trực tiếp bằng enzym horseradish peroxidase.

b. Các bước tiến hành

Sử dụng bộ kit ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection Systems (Amersham) với các bước tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất như sau:

- Chuẩn bị mẫu dò:

+ Khuếch đại gen *blaTEM*, *blaCTX-M-1* và *blaCTX-M-9* bằng phản ứng PCR, tinh sạch sản phẩm PCR bằng kit tinh sạch QIAGEN và điều chỉnh về nồng độ DNA 10ng/μl bằng nước siêu sạch.

+ Biến tính 100ng sản phẩm PCR (10μl) bằng cách đun sôi trong bể ủ nhiệt 5 phút. Làm lạnh DNA bằng cách cho vào hộp đá bào trong 5 phút.

+ Nhỏ 10μl dung dịch hóa chất đánh dấu DNA, lắc nhẹ cho đều. Nhỏ 10μl dung dịch glutaraldehyde, lắc đều và tập trung hỗn dịch bằng cách ly tâm nhẹ. Ủ 20 phút ở 37°C.

+ Sản phẩm *blaTEM*, *blaCTX-M-1* và *blaCTX-M-9* sau khi đánh dấu nếu không sử dụng ngay có thể được giữ ở trong 30% glycerol ở -15°C đến -30°C trong 6 tháng.

- Thực hiện phản ứng S1-PFGE:

Phản ứng S1-PFGE được thực hiện với các chủng vi khuẩn mang gen

blaTEM, *blaCTX-M-1* và *blaCTX-M-9* và chủng chuẩn *Braenderup* H9812 theo quy trình của nhà sản xuất. Sản phẩm của phản ứng được nhuộm trong dung dịch ethidium bromide và chụp ảnh để xác định số lượng và kích thước plasmid của các chủng vi khuẩn.

- Chuyển DNA plasmid sang màng lai Hybond-N:

+ Rửa gel bằng các dung dịch: 250ml HCL 0,25 M lạnh trong 7 phút. 250 ml dung dịch biến tính (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) lạnh trong 20 phút và 300 ml dung dịch trung hòa (1.0 M TrisHCl, 1.5 M NaCl, pH 7.5) lạnh trong 20 phút.

+ Chuyển các plasmid sang màng lai Hybond-N bằng dung dịch chuyển màng SSC 20X (3 M NaCl, 300 mM Natri Citrate, pH 7.0) ở áp lực chân không là 50 mbar trong 90 phút.

+ Lấy màng lai ra khỏi hộp chuyển màng và rửa bằng dung dịch chuyển màng SSC 20X trong 10 phút và làm khô trong 15 phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm.

+ Xử lý màng lai bằng tia cực tím (UV-cross linking) ở cường độ 150mJ trong 5 phút. Rửa màng lai trong H₂O và làm khô trong không khí sau đó được gói trong giấy bạc và giữ ở 40° C.

- Thực hiện phản ứng lai:

+ Ủ màng lai trong 20ml dung dịch tiền lai (gold hydridization buffer có chứa 5% hoá chất phủ màng) đã được làm ấm ở 42° C trong 1 giờ.

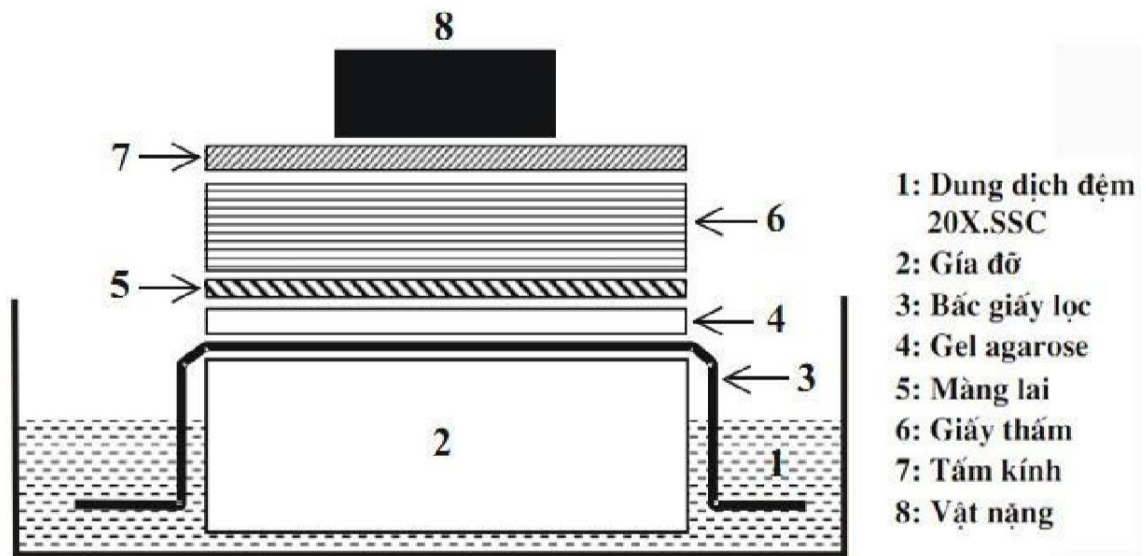
+ Lấy màng lai từ dung dịch tiền lai cho vào tube lai nhỏ 20ml dung dịch lai (dung dịch tiền lai + 60µl các đoạn dò *blaTEM*, *blaCTX-M-1* và *blaCTX-M-9* đã được đánh dấu và ủ ấm ở 42° C).

+ Cho tube lai vào lò lai UPV HL-2000 HybriLinker, lai ở 42° C qua đêm

+ Dừng phản ứng lai, rửa màng bằng 300ml dung dịch rửa SSC 2X đã được ủ 42°C trong 20 phút (2 lần). Rửa lần cuối bằng dung dịch SSC 2X trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.

- Hiện màng

+ Trộn dung dịch A và dung dịch B với tỷ lệ 40:1. Nhỏ dung dịch lên màng và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút đến 1 giờ. Sử dụng film Hyper để phát hiện các plasmid mang gen *bla TEM*, *blaCTX-M-1* và *blaCTX-M-9*.



Hình 2.5. Hình ảnh minh họa kỹ thuật Southern Blot

c. Nhận định kết quả

Sử dụng ảnh chụp gen các plasmid trước khi lai và ảnh plasmid sau khi lai để phát hiện số lượng và kích thước các plasmid mang gen *blaTEM*, *blaCTX-M-1* và *blaCTX-M-9*.

2.5.13. Đánh giá khả năng truyền các gen mã hóa sinh ESBL của các chủng *E. coli* sinh ESBL trong mô hình phòng thí nghiệm bằng phương pháp tiếp hợp

a. Nguyên lý

Hiện tượng tiếp hợp xảy ra khi hai tế bào vi khuẩn tiếp xúc trực tiếp với nhau, tế bào vi khuẩn nào có plasmid F gọi là tế bào đực (F+) và có thể truyền vật liệu di truyền cho tế bào không có plasmid F gọi là tế bào cái (F-) thông qua pili sinh dục. Thử nghiệm tiếp hợp giữa các chủng *E. coli* sinh ESBL và *E. coli* J53AzR (*E. coli* mang gen kháng NaN₃ và không chứa plasmid) được

thực hiện để xác định khả năng truyền các gen mã hóa sinh ESBL của các chủng *E. coli* sinh ESBL.

b. Các bước tiến hành

* Chuẩn bị chủng vi khuẩn

- *Chủng nhận*: Cây *E. coli* J53 lên MacConkey có NaN₃, ủ 37°C qua đêm. Chọn một khuẩn lạc cấy sang 3ml canh thang LB, ủ 37°C trong 5 - 6 giờ.

- *Chủng cho*: Cây 52 chủng *E. coli* sinh ESBL (đã được xác định gen mã hóa ESBL) lên thạch Chrom Agar ECC có chứa 1µg/ml cefotaxim, ủ qua đêm ở 37°C. Chọn một khuẩn lạc chủng “cho” cấy sang 3ml canh thang LB có chứa 1µg/ml cefotaxim ủ 37°C trong 5-6 giờ.

* Quy trình tiếp hợp

- Ly tâm 3ml chủng “cho” 6000 vòng/5 phút, loại bỏ dịch nổi lấy tế bào. Hoàn nguyên cặn tế bào trong 3ml canh thang LB (không có kháng sinh).

- Nhỏ 3ml dung dịch vi khuẩn *E. coli* J53 (OD=0,5) trộn đều sau đó ly tâm hỗn dịch chủng “cho” và chủng “nhận” 6000/5 phút, loại bỏ dịch nổi giữ lại cặn tế bào. Ủ cặn tế bào vi khuẩn 37°C trong 2 giờ (cho vi khuẩn tiếp hợp truyền plasmid).

- Hoàn nguyên cặn tế bào trong 6ml nước muối sinh lý. Nhỏ 100 µl sang thạch MacConkey có chứa 1µg/ml cefotaxim và 100µg/ml sodium azide, ủ 37°C trong 24 - 48 giờ.

- Chọn khuẩn lạc *E. coli* J53 màu đỏ tươi mọc trên môi trường chọn lọc (kháng sodium azide và cefotaxim) cấy sang đĩa thạch Muller- Hilton.

* Kiểm tra gen mã hóa ESBL của vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR đa môi

- Tách chiết DNA: bằng phương pháp đun sôi

- Thực hiện phản ứng PCR: Sử dụng kỹ thuật PCR đa môi để phát hiện sự lưu hành các gen mã hóa sinh ESBL là *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-9* và *blaTEM*.

c. Nhận định kết quả

Nếu sau quá trình tiếp hợp có các khuẩn lạc *E. coli* J53 màu đỏ tươi mọc trên môi trường chọn lọc (có NaN_3 và cefotaxim) và các khuẩn lạc này có chứa các gen mã hóa sinh ESBL tương tự như các gen mã hóa sinh ESBL của các chủng *E. coli* sinh ESBL dùng làm chủng cho thì chứng tỏ có xảy ra hiện tượng tiếp hợp.

2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được nhập vào máy tính và quản lý bằng phần mềm Epidata 3.1. Số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm SPSS 22. Cả thống kê mô tả và thống kê suy luận được thực hiện.

Thống kê mô tả được thực hiện thông qua tính toán giá trị trung bình, trung vị, độ lệch chuẩn (đối với các số liệu định lượng như tuổi ...) và tần số, tỷ lệ phần trăm (đối với các số liệu định tính như tỷ lệ nhiễm *E. coli*, tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL, tỷ lệ kháng kháng sinh, tỷ lệ xuất hiện các kiểu gen mã hóa sinh ESBL, phylogenetic, tỷ lệ gen độc lực, plasmid...).

Trắc nghiệm thống kê Chi bình phương được thực hiện để so sánh tỷ lệ mắc bệnh giữa các nhóm sử dụng mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$. Kết quả nghiên cứu được trình bày dưới dạng bảng, biểu đồ.

2.7. Biện pháp khống chế sai số

Hạn chế sai số có thể gặp trong nghiên cứu bằng cách:

Chọn các cán bộ có kinh nghiệm, đã được đào tạo và nắm vững kỹ thuật để làm xét nghiệm. Sử dụng các kỹ thuật xét nghiệm chuẩn, tuân thủ thường qui xét nghiệm. Hệ thống máy móc sử dụng cho xét nghiệm được kiểm định trước nghiên cứu.

Hóa chất sử dụng trong xét nghiệm là hóa chất của các công ty có uy tín trong lĩnh vực vi sinh và sinh học phân tử.

2.8. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm *E. coli* sinh men β -lactamase phổ mở rộng ở người tại một số hộ gia đình tại xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình nhằm cung cấp thông tin về tình trạng mang gen kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* trên người khỏe mạnh tại cộng đồng. Sau khi có kết quả xét nghiệm, nhóm nghiên cứu đã thông báo cho chủ hộ biết và truyền thông hướng dẫn gia đình về các biện pháp nhằm hạn chế sự lây nhiễm và lan truyền các vi khuẩn kháng kháng sinh.

Đề cương nghiên cứu đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu khoa học của Trường Đại học Y Dược Thái Bình thẩm định và chấp thuận phê duyệt cho triển khai nghiên cứu tại văn bản số 968a/CV-YDTB, ngày 9/12/2015.

Các đối tượng tham gia nghiên cứu đều được giải thích về mục đích yêu cầu của nghiên cứu và chỉ tiến hành nghiên cứu với những đối tượng tự nguyện tham gia nghiên cứu. Các thông tin về đối tượng nghiên cứu được mã hóa, bảo mật. Các kỹ thuật thực hiện trong nghiên cứu không gây tổn hại đến sức khỏe của đối tượng nghiên cứu.

Các thông tin thu thập được từ đề tài chỉ phục vụ cho mục đích duy nhất là nghiên cứu khoa học.

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Sự lưu hành của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh tại cộng đồng nông thôn tỉnh Thái Bình

3.1.1. Đặc điểm của đối tượng xét nghiệm

Bảng 3.1. Đặc điểm chung của đối tượng xét nghiệm

Tổng số		212
Giới	Nam	101 (47,6%)
	Nữ	111 (52,4%)
Tuổi	Thấp nhất	1
	Cao nhất	89
	Trung bình	40,14 ± 23,08
Hộ gia đình	Số hộ gia đình	59
	Số thành viên thấp nhất	2
	Số thành viên cao nhất	7
	Số thành viên trung bình	3,59

Đối tượng nghiên cứu của chúng tôi là 212 người, trong đó có 101 nam và 111 nữ. Các đối tượng này có độ tuổi từ 1 đến 89 tuổi, trung bình là 40,14 tuổi; sống trong 59 hộ gia đình có từ 1 đến 7 thành viên.

Bảng 3.2. Đặc điểm của đối tượng xét nghiệm theo nhóm tuổi

Nhóm tuổi	Số lượng	Tỷ lệ (%)
0 - 9	26	12,3
10 -19	31	14,6
20-29	21	9,9
30-39	25	11,8
40-49	23	10,8
50-59	38	17,9
60-69	25	11,8
70-79	14	6,6
80-89	9	4,2
Tổng	212	100,0

Trong nghiên cứu này, những người xét nghiệm thuộc nhóm tuổi 50-59 chiếm tỷ lệ cao nhất (17,9%), nhóm tuổi 80-89 chiếm tỷ lệ thấp nhất (4,2%). Các đối tượng nghiên cứu phân bố khá đồng đều ở các nhóm tuổi còn lại.

Bảng 3.3. Đặc điểm hộ gia đình của các đối tượng xét nghiệm

Số thành viên	Số lượng	Tỷ lệ (%)
2 thành viên	13	22,0
3 thành viên	18	30,5
4 thành viên	15	25,4
5 thành viên	7	11,9
6 thành viên	5	8,5
7 thành viên	1	1,7
Tổng	59	100,0

Các đối tượng nghiên cứu của chúng tôi thuộc 59 hộ gia đình với số thành viên từ 2 -7 người trong 1 hộ gia đình. Trong đó số hộ gia đình có 3 và 4 thành viên chiếm tỷ lệ cao nhất với tỷ lệ lần lượt là 30,5% và 25,4%.

Bảng 3.4. Đặc điểm đối tượng xét nghiệm theo trình độ học vấn

Trình độ	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Đại học/Cao đẳng/Trung cấp	19	9,0
Trung học phổ thông	53	25,0
Trung học cơ sở	106	50,0
Tiểu học	21	9,9
Chưa biết chữ	13	6,1
Tổng	212	100,0

Kết quả bảng 3.4 cho thấy các đối tượng tham gia xét nghiệm có trình độ trung học cơ sở là phổ biến nhất (50%), tiếp đến là có trình độ trung học phổ thông (25%), đối tượng có trình độ từ trung cấp trở lên là 9%. Các đối tượng có trình độ tiểu học và chưa biết chữ chiếm tỷ lệ thấp.

Bảng 3.5. Đặc điểm đối tượng xét nghiệm theo nghề nghiệp

Nghề nghiệp	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Làm ruộng	92	43,6
Cán bộ	9	4,2
Công nhân	23	10,8
Thủ công	13	6,1
Cán bộ hưu	11	5,2
Buôn bán	8	3,8
Học sinh, sinh viên	43	20,2
Còn nhỏ (<6 tuổi)	13	6,1
Tổng	212	100,0

Phần lớn đối tượng trong nghiên cứu của chúng tôi là làm ruộng (43,6%), học sinh sinh viên (20,2%). Các đối tượng làm các nghề khác chiếm tỷ lệ thấp.

3.1.2. Sự lưu hành của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh

Bảng 3.6. Kết quả cấy mẫu phân người trên MacConkey có CTX 1µg/ml

Vi khuẩn mọc trên MacConkey có CTX	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>E. coli</i>	169	79,7
Không phải <i>E. coli</i>	28	13,2
Không có vi khuẩn mọc	15	7,1
Tổng	212	100,0

Khi xét nghiệm mẫu phân của 212 người khỏe mạnh tại cộng đồng xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư, chúng tôi thấy: 79,7 % người khỏe mạnh mang vi khuẩn *E. coli* kháng CTX, 13,2 % mang vi khuẩn đường ruột khác kháng CTX và 7,1% không có vi khuẩn đường ruột kháng CTX mọc.

Bảng 3.7. Tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh

<i>E. coli</i> sinh ESBL	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Trong cộng đồng (n=212)	137	64,6
Trong các chủng <i>E. coli</i> kháng CTX (n=169)	137	81,1

Kết quả ở bảng 3.7 cho thấy: tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh trong cộng đồng là 64,6%. Đặc biệt tỷ lệ sinh ESBL của các chủng *E. coli* kháng CTX được phân lập từ những người khỏe mạnh chiếm tỷ lệ rất cao (81,1%).

Bảng 3.8. Tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL theo nhóm tuổi

Nhóm tuổi	Số lượng	Tỷ lệ (%)	p
0 - 9 (n=26) (1)	16	61,5	$p_{(6,7)} < 0,05$; $p_{(6,5)} < 0,05$; $p_{(6,4)} < 0,05$
10 -19 (n=31) (2)	21	67,7	
20-29 (n=21) (3)	13	61,9	
30-39 (n=25) (4)	14	56,0	
40-49 (n=23) (5)	13	56,5	
50-59 (n=38) (6)	31	81,6	
60-69 (n=25) (7)	13	52,0	
70-79 (n=14) (8)	10	71,4	
80-89 (n=9) (9)	6	66,7	
Tổng	137	64,6	

Về độ tuổi của các đối tượng nhiễm *E. coli* sinh ESBL chúng tôi nhận thấy: *E. coli* sinh ESBL có thể xuất hiện ở bất cứ lứa tuổi nào từ trẻ em đến người già. Tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL ở nhóm tuổi 50-59 (81,6%) cao hơn so với các nhóm tuổi 30-39, 40-49 và 60-69 (với $p < 0,05$).

Bảng 3.9. Tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL theo giới tính

Giới	Số lượng	Tỷ lệ (%)	p
Nữ (n=111)	72	64,9	>0,05
Nam (n=101)	65	64,4	
Tổng (n=212)	137	64,6	

Tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL ở nam là 64,9% và ở nữ là 64,4%. Không có sự khác biệt về tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL giữa 2 giới ($p > 0,05$).

Bảng 3.10. Số người mang *E. coli* sinh ESBL trong các hộ gia đình

Số người mang <i>E. coli</i> sinh ESBL trong 1 hộ gia đình	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Không có người mang	4	6,8
1 người	10	16,9
2 người	25	42,4
3 người	11	18,6
4 người	5	8,5
5 người	1	1,7
6 người	2	3,4
7 người	1	1,7
Tổng	59	100,0

Kết quả bảng 3.10 cho thấy tỷ lệ hộ gia đình có 2 người mang *E. coli* sinh ESBL chiếm tỷ lệ cao nhất (42,4,0%), thấp nhất là hộ gia đình có 7 người mang *E. coli* sinh ESBL (1,7%).

Bảng 3.11. Tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL theo các hộ gia đình

Số thành viên trong gia đình mang <i>E. coli</i> sinh ESBL	Số lượng	Tỷ lệ (%)
100 % thành viên	21	35,6
60% đến < 100% thành viên	16	27,1
30 % đến < 60 % thành viên	13	22,0
Dưới 30 % thành viên	5	8,5
Tổng số hộ có thành viên mang	55	93,2
Số hộ không có thành viên mang	4	6,8
Tổng	59	100,0

Kết quả ở bảng 3.11 cho thấy, *E. coli* sinh ESBL được phát hiện ở hầu hết các hộ gia đình có người tham gia nghiên cứu (55/59=93,2%). Trong đó số hộ gia đình có tất cả các thành viên mang *E. coli* sinh ESBL chiếm tỷ lệ cao nhất (35,6%) và số hộ gia đình có dưới 30% thành viên mang chiếm tỷ lệ thấp nhất (8,5%). Chỉ có 4 hộ gia đình (6,8%) là không có thành viên nào mang *E. coli* sinh ESBL.

Bảng 3.12. Tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL theo trình độ học vấn

Nhóm tuổi	Số lượng	Tỷ lệ (%)	p
Đại học/Cao đẳng/Trung cấp	13	68,4	>0,05
Trung học phổ thông	37	69,8	
Trung học cơ sở	67	63,2	
Tiểu học	12	57,1	
Chưa biết chữ	8	61,5	
Tổng	137	64,6	

Phân tích tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL theo trình độ học vấn chúng tôi nhận thấy: nhóm có trình độ tiểu học có tỷ lệ mang *E.coli* sinh ESBL chiếm tỷ lệ thấp nhất (57,1%), nhóm có trình độ trung học phổ thông chiếm tỷ lệ cao nhất (69,8%). Tuy nhiên sự khác biệt về tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL theo trình độ học vấn là không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3.13. Tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL theo nghề nghiệp

Nghề nghiệp	Số lượng	Tỷ lệ (%)	p
Làm ruộng	58	63,0	> 0,05
Cán bộ	7	77,8	
Công nhân	16	69,6	
Thủ công	10	76,9	
Cán bộ hưu	5	45,5	
Buôn bán	5	62,5	
Học sinh, sinh viên	28	65,1	
Còn nhỏ (<6 tuổi)	8	61,5	
Tổng	137	64,6	

Tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL cao nhất ở nhóm cán bộ (77,8%), thấp nhất ở nhóm cán bộ hưu (45,5%). Tuy nhiên không có sự khác biệt về tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL giữa các nhóm nghề nghiệp, với $p > 0,05$.

3.2. Đặc điểm sinh học của các chủng *E. coli* sinh ESBL

3.2.1. Đặc điểm sinh vật, hóa học của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Bảng 3.14. Một số tính chất sinh vật, hóa học của *E. coli* sinh ESBL

Tính chất	Có		Không có hoặc không rõ ràng	
	n	%	n	%
Lên men Glucose	137	100,0	0	0
Lên men lactose hoặc sucrose	137	100,0	0	0,0
Sinh gas	129	94,2	8	5,8
Sinh H ₂ S	0	0,0	137	0
Khả năng decarboxylation Lysine	110	80,3	27	19,7
Sinh indol	130	94,9	7	5,1
Di động	106	77,4	31	22,6
Lên men đường lactose	121	88,3	16	11,7
Lên men cellobiose	0	0,0	137	100,0
Thủy phân β – glucuronidase	108	78,8	29	21,2

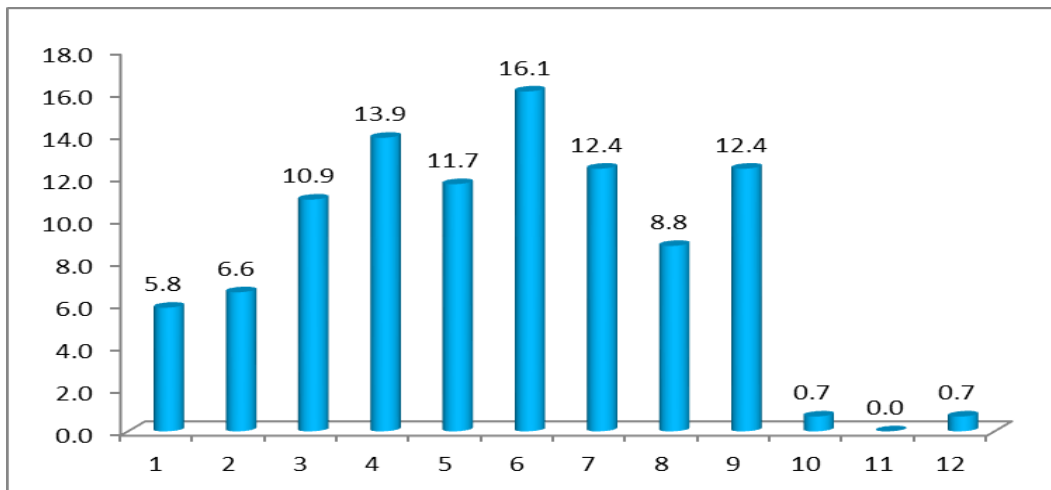
Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.14 cho thấy: 78,8% các chủng được xác định là *E. coli* dựa vào các tính chất sinh vật, hóa học điển hình trên 3 môi trường TSI, LIM, và CLIG như: Lên men glucose (+), không sản xuất H₂S, sinh Indol (+), lên men cellobiose (-), thủy phân β -glucuronidase (+). Các chủng còn lại được tiếp tục được xác định bằng API 20E và kết quả khẳng định các chủng này là *E. coli*.

3.2.2. Đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Bảng 3.15. Tỷ lệ kháng các loại kháng sinh của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Loại KS	Nhạy cảm	Trung gian	Kháng
	Số lượng (%)		
AMP	0 (0,0)	0 (0,0)	137 (100,0)
CAZ	35 (25,5)	59 (43,1)	43 (31,4)
FOX	130 (94,9)	1 (0,7)	6 (4,4)
MEM	135 (98,5)	0 (0,0)	2 (1,5)
STR	20 (14,6)	24 (17,5)	93 (67,9)
KAN	87 (63,5)	21 (15,3)	29 (21,2)
GEN	91 (66,4)	2 (1,5)	44 (32,1)
CIP	82 (59,9)	4 (2,9)	51 (37,2))
NAL	57 (41,6)	2 (1,5)	78 (56,9)
TET	29 (21,2)	2 (1,5)	106 (77,4)
CHL	88 (64,2)	2 (1,5)	47 (34,3)
SXT	26 (19)	0 (0,0)	111(81,0)
FOF	134 (97,8)	1 (0,7)	2 (1,5)

Kết quả ở bảng 3.15 cho thấy các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL kháng hoàn toàn với kháng sinh ampicillin, các kháng sinh thông dụng cũng bị kháng với tỷ lệ khá cao từ 21,2% đến 81%. Tuy nhiên các vi khuẩn này còn nhạy cảm với 1 số kháng sinh như cefoxitin, fosfomycin và meropenem.



Biểu đồ 3.1. Số lượng kháng sinh bị kháng ở các chủng *E. coli* sinh ESBL

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy các chủng *E. coli* sinh ESBL đã kháng từ 1 đến 12 trong số 13 kháng sinh được thử nghiệm, trong đó phổ biến nhất là kháng từ 3 đến 9 kháng sinh.

Bảng 3.16. Mức độ kháng đa thuốc của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Số nhóm KS không nhạy cảm	Số chủng	Tỉ lệ (%)	Phân loại (%)
1	8	5,8	Không phải MDR (13,9%)
2	11	8,0	
3	15	10,9	
4	21	15,3	MDR (86,1%)
5	36	26,3	
6	31	22,6	
7	14	10,2	
9	1	0,7	
Tổng	137	100,0	

Kết quả đánh giá mức độ kháng đa thuốc ở bảng 3.16 cho thấy tất cả các chủng *E. coli* sinh ESBL đều không nhạy cảm với ít nhất 1 nhóm kháng sinh trở lên. Số chủng kháng đa thuốc (MDR- không nhạy cảm với 3 nhóm kháng sinh trở lên) chiếm 86,1%, trong đó số chủng không nhạy cảm với 5 và

6 nhóm kháng sinh là phổ biến nhất với tỷ lệ lần lượt là 26,3 và 22,6%.

3.2.3. Đặc điểm các gen mã hóa sinh ESBL ở các chủng *E. coli* sinh ESBL

Bảng 3.17. Tỷ lệ mang các kiểu gen mã hóa sinh ESBL nhóm CTX của các chủng *E. coli* sinh ESBL

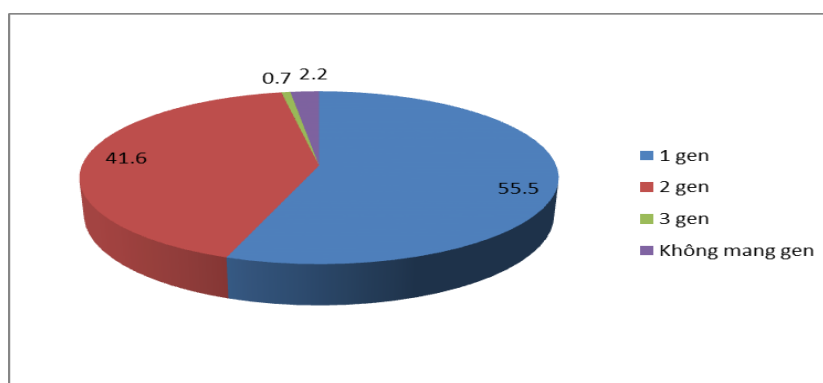
Kiểu gen mã hóa sinh ESBL nhóm CTX	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>blaCTX-M-1</i>	36	26,3
<i>blaCTX-M-9</i>	91	66,3
<i>blaCTX-M-2</i>	0	0
<i>blaCTX-M-8/25</i>	0	0
<i>blaCTX-M-1/CTX-M-9</i>	2	1,5
Không phát hiện	8	5,9
Tổng	137	100,0

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có 94,1% các chủng *E. coli* sinh ESBL mang các gen mã hóa sinh ESBL nhóm CTX-M. Trong đó 66,3% số chủng *E. coli* sinh ESBL mang gen *blaCTX-M-9*, 26,3% mang gen *blaCTX-M-1* và 1,5% mang cả 2 gen *blaCTX-M-9* và *blaCTX-M-1*. Chúng tôi không phát hiện được chủng nào mang gen *blaCTX-M-2* và *blaCTX-M-8/25*. Có 8 chủng không phát hiện thấy mang các gen mã hóa sinh CTX nói trên.

Bảng 3.18. Tỷ lệ mang các kiểu gen mã hóa sinh ESBL nhóm TEM, SHV của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Kiểu gen mã hóa sinh ESBL nhóm TEM, SHV	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>blaTEM</i>	62	45,3
<i>blaSHV</i>	0	0
Không phát hiện	75	54,7
Tổng	137	100,0

Trong các chủng nghiên cứu, chúng tôi phát hiện thấy có 82 chủng (45,3%) mang kiểu gen *blaTEM*, không có chủng nào mang kiểu gen *blaSHV*, 54,7% số chủng nghiên cứu không mang gen *blaTEM* hoặc *blaSHV*.



Biểu đồ 3.2. Số lượng gen mã hóa sinh ESBL của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL có thể mang một hoặc nhiều gen mã hóa sinh ESBL. Kết quả ở biểu đồ 3.2 cho thấy 55,5% số chủng *E. coli* sinh ESBL mang 1 gen mã hóa sinh ESBL, số chủng mang 2 gen mã hóa sinh ESBL chiếm tỷ lệ 41,6% và 1 chủng mang đồng thời 3 gen mã hóa ESBL (0,7%).

Bảng 3.19. Tỷ lệ xuất hiện các kiểu gen mã hóa sinh ESBL của *E. coli* sinh ESBL

Kiểu gen mã hóa sinh ESBL	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>blaCTX-M-1</i>	13	9,5
<i>blaCTX-M-1/CTX-M-9</i>	1	0,7
<i>blaCTX-M-1/CTX-M-9/TEM</i>	1	0,7
<i>blaCTX-M-1/TEM</i>	23	16,8
<i>blaCTX-M-9</i>	58	42,3
<i>blaCTX-M-9/TEM</i>	33	24,1
<i>blaTEM</i>	5	3,6
Không phát hiện được các gen ở trên	3	2,2
Tổng	137	100,0

Kết quả ở bảng 3.19 cho thấy kiểu gen phổ biến nhất là *blaCTX-M-9*, tiếp đến là các kiểu kết hợp mang đồng thời 2 gen như *blaCTX-M-9/TEM* (24,1%), *blaCTX-M-1/TEM* (16,8%). Các kiểu gen khác chiếm tỷ lệ thấp.



Hình 3.1. Hình ảnh điện di các gen nhóm *blaCTX*, *blaTEM* và *blaSHV*

Chú thích: M: Marker 100bp, PC: Chứng dương (a: *blaCTX-M-1* (588bp), b: *blaCTX-M-9* (475bp), c: *blaTEM* (372bp), d: *blaSHV* (231bp), e: *blaCTX-M-8/25* (186bp), f: *blaCTX-M-2* (107bp), NC: Chứng âm, 1- 8: các mẫu

Bảng 3.20. Tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* sinh ESBL mang kiểu gen *blaCTX-M-1* và *blaCTX-M-9*

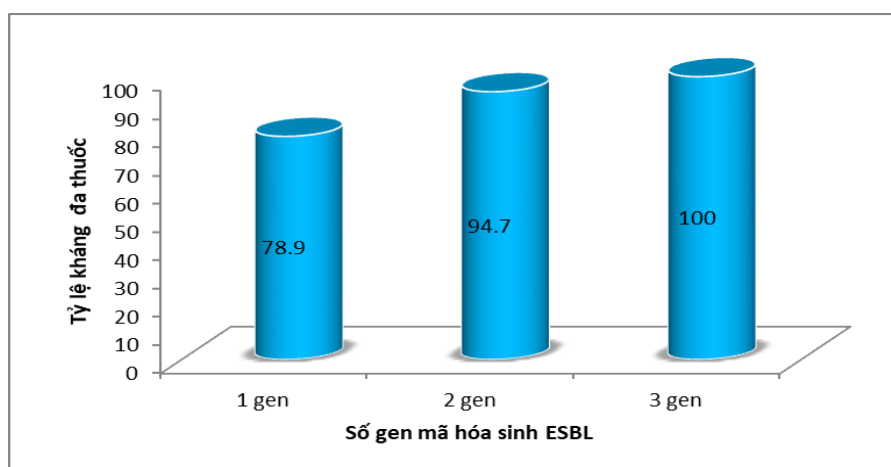
Tên kháng sinh	<i>blaCTX-M-1</i> (n=36)		<i>blaCTX-M-9</i> (n=91)		p
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
AMP	36	100,0	91	100,0	> 0,05
CAZ	23	63,9	15	16,5	<0,05
FOX	1	2,8	5	5,5	> 0,05
MEM	0	0,0	2	2,2	> 0,05
STR	27	75,0	57	62,6	> 0,05
KAN	17	47,2	11	12,1	< 0,05
GEN	15	41,7	27	29,7	> 0,05
CIP	23	63,9	25	27,5	< 0,05
NAL	27	75,0	44	48,4	< 0,05
TET	30	83,3	67	73,6	> 0,05
CHL	20	55,6	24	26,4	< 0,05
SXT	30	83,3	71	78,0	> 0,05
FOF	1	2,8	1	1,1	> 0,05

Phân tích tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* mang kiểu gen mã hóa sinh ESBL khác nhau cho thấy: các chủng *E. coli* mang kiểu gen *blaCTX-M-1* có tỷ lệ kháng với 1 số loại kháng sinh như CAZ, KAN, NAL, CHL cao hơn so với các chủng mang kiểu gen *blaCTX-M-9*.

Bảng 3.21. Phân bố tỷ lệ kháng đa thuốc theo các kiểu gen mã hóa ESBL

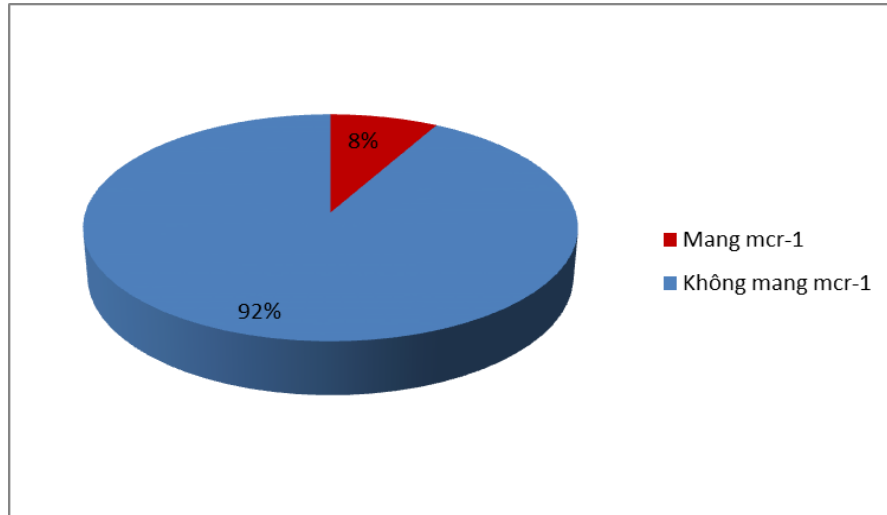
Gen mã hóa ESBL	Số lượng	Tỷ lệ	p
<i>blaCTX-M-1</i> (n=13) (1)	9	69,2	
<i>blaCTX-M-1/CTX-M-9</i> (n=1)(2)	1	100	
<i>blaCTX-M-1/CTX-M-9/TEM</i> (n=1)(3)	1	100	
<i>blaCTX-M-1/TEM</i> (n=23)(4)	22	95,7	$p_{(1,4)} < 0,05$;
<i>blaCTX-M-9</i> (n=58)(5)	46	79,3	$p_{(1,6)} < 0,05$
<i>blaCTX-M-9/TEM</i> (n=33)(6)	31	93,9	
<i>blaTEM</i> (n=5)(7)	5	100	
Tổng	122	91,0	

Phân tích sự phân bố tỷ lệ kháng đa thuốc theo kiểu gen của các chủng *E. coli* sinh ESBL chúng tôi nhận thấy: tất cả các chủng mang các kiểu gen *blaTEM*, *blaCTX-M-1/CTX-M-9/TEM* và *blaCTX-M-1/CTX-M-9* đều là chủng kháng đa thuốc. Các chủng mang các gen *blaCTX-M-1/TEM*, *blaCTX-M-9/TEM* là các chủng kháng đa thuốc rất cao (>90%). Các chủng mang *blaCTX-M-1* có tỷ lệ kháng đa thuốc thấp nhất (69,2%).



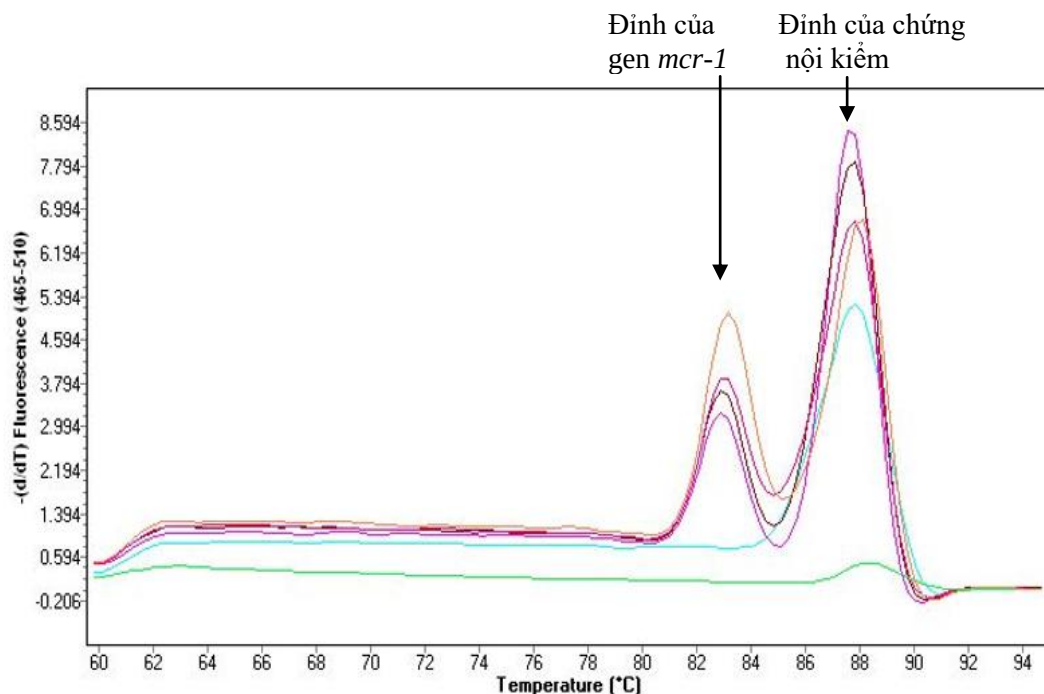
Biểu đồ 3.3. Tỷ lệ kháng đa thuốc theo số lượng gen mã hóa sinh ESBL

Kết quả ở biểu đồ 3.3 cho thấy các chủng *E. coli* mang càng nhiều gen mã hóa sinh ESBL thì tỉ lệ kháng đa thuốc càng cao.



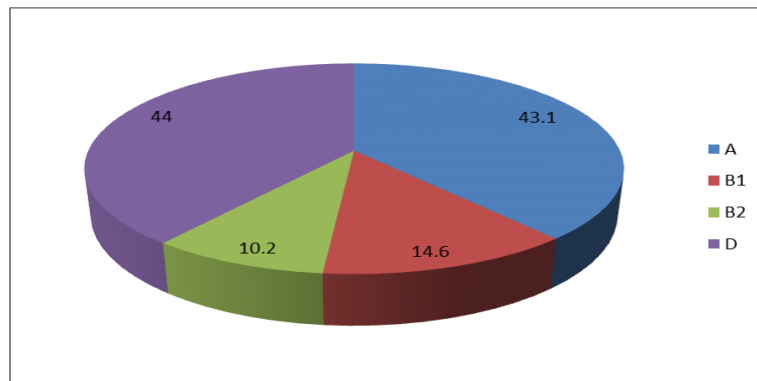
Biểu đồ 3.4. Tỷ lệ các chủng *E. coli* mang gen *mcr-1*

Đánh giá khả năng kháng colistin của các chủng *E. coli* sinh ESBL chúng tôi nhận thấy có 11/137 (8,0%) các chủng *E. coli* sinh ESBL mang gen *mcr-1* kháng colistin.



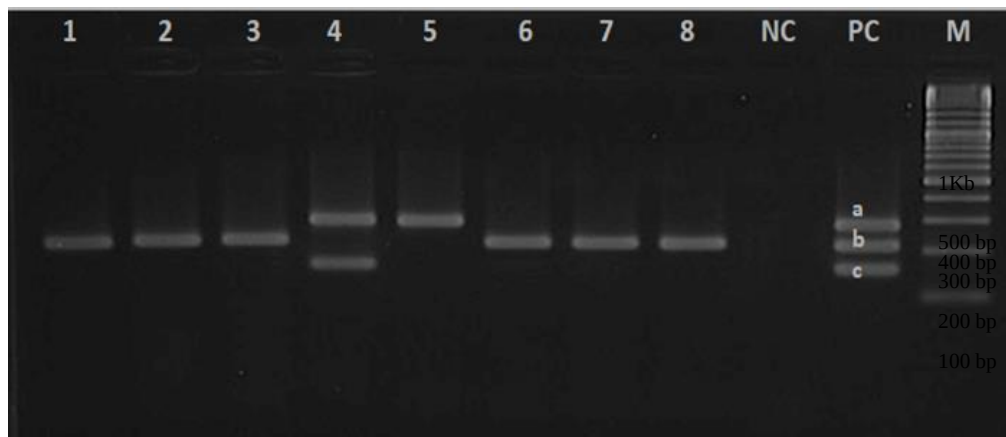
Biểu đồ 3.5. Biểu đồ minh họa kết quả realtime-PCR xác định gen *mcr-1*

3.2.4. Đặc điểm phân nhóm phát sinh loài của các chủng *E. coli* sinh ESBL



Biểu đồ 3.6. Tỷ lệ các nhóm phát sinh loài của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Phân tích đặc điểm nhóm phát sinh loài của các chủng *E. coli* sinh ESBL phân lập từ mẫu phân người khỏe mạnh chúng tôi nhận thấy: Có sự xuất hiện của cả 4 nhóm phát sinh loài, trong đó nhóm A chiếm tỉ lệ cao nhất (43,1 %), tiếp theo là nhóm D (32,1%), nhóm B1 (14,6%) và nhóm B2 chiếm tỉ lệ thấp nhất (10,2 %).



Hình 3.2. Hình ảnh điện di các gen xác định nhóm phát sinh loài

Chú thích: M: Marker 100bp, PC: Chứng dương (a: *ChuA* (279 bp), b: *YjiA* (211bp), c: *TspE4C2* (152 bp), NC: Chứng âm, 1-8: các mẫu.

*** Đặc điểm kháng kháng sinh theo các nhóm phát sinh loài**

Bảng 3.22. Tỷ lệ kháng kháng sinh theo nhóm phát sinh loài

	A (1)	B1 (2)	B2 (3)	D (4)	p
	Số lượng (%)				
AMP	59 (100,0)	20 (100,0)	14 (100,0)	44 (100,0)	> 0,05
CAZ	15 (25,4)	5 (25,0)	4 (28,6)	19 (43,2)	> 0,05
FOX	1 (1,7)	0 (0,0)	1 (7,1)	4 (9,1)	> 0,05
MEM	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (7,1)	1 (2,3)	> 0,05
STR		10 (50,0)		31 (70,5)	$p_{(1,3)} < 0,05$;
	39 (66,1)		13 (92,9)		$p_{(2,3)} < 0,05$;
					$p_{(4,3)} < 0,05$
KAN	17 (28,8)	5 (25,0)	0 (0,0)	7 (15,9)	> 0,05
GEN	27 (45,8)	5 (25)	3(21,4)	9 (20,5)	$P_{(1,4)} < 0,05$
CIP	24 (40,7)	9 (45,0)	8 (57,1)	10 (22,7)	$P_{(3,4)} < 0,05$
NAL	36 (61,0)	9 (45,0)	9 (64,3)	24 (54,5)	> 0,05
TET	48 (81,4)	13 (65,0)	11 (78,6)	34 (77,3)	> 0,05
CHL	23 (39,0)	10 (50,0)	4 (28,6)	10 (22,7)	$p_{(2,4)} < 0,05$
SXT	49 (83,1)	15(75,0)	12 (85,7)	35 (79,5)	> 0,05
FOF	1 (1,7)	0 (0,0)	1 (7,1)	0 (0,0)	> 0,05

Đánh giá mức độ kháng kháng sinh của các nhóm phát sinh loài của các chủng *E. coli* sinh ESBL cho thấy: Các chủng này đều kháng AMP và CTX với tỷ lệ 100%. Tỷ lệ kháng các kháng sinh streptomycin, gentamycin, ciprofloxacin, và chloramphenicol khác nhau tùy từng loài: Tỷ lệ kháng streptomycin của nhóm B2 cao hơn hẳn so với 3 nhóm còn lại ($p < 0,05$). Tỷ lệ kháng gentamycin của nhóm A cao hơn so với nhóm D ($p < 0,05$). Tỷ lệ kháng của nhóm B2 với ciprofloxacin cao hơn so với nhóm D ($p < 0,05$). Tỷ lệ kháng chloramphenicol ở nhóm B1 cao hơn so với nhóm D.

Bảng 3.23. Phân bố mức độ kháng đa thuốc theo nhóm phát sinh loài

	Số lượng	(%)	p
A (n=59)	52	88,1	> 0,05
B1 (n=20)	16	80,0	
B2 (n=14)	13	92,9	
D (n=44)	37	84,1	
Tổng	118	86,1	

Kết quả ở bảng 3.23 cho thấy tỷ lệ kháng đa thuốc cao nhất ở phân nhóm B2 (92,9%), tiếp đến là nhóm A (88,1%), nhóm D (84,1%) và thấp nhất ở nhóm B1 (80,0%). Tuy nhiên sự khác biệt về tỷ lệ kháng đa thuốc giữa các nhóm phát sinh loài không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

3.2.5. Đặc điểm các gen độc lực trong các chủng *E. coli* sinh ESBL

Bảng 3.24. Phân bố gen độc lực ở các chủng *E. coli* sinh ESBL

<i>E. coli</i> gây tiêu chảy	Tên gen độc lực	Số lượng	Tỷ lệ (%)
EAEC	<i>AstA</i>	29	21,1
EPEC	<i>AstA, bfpA</i>	6	4,4
	<i>bfpA</i>	8	5,8
	<i>eaeA</i>	6	4,4
	<i>AstA, eaeA</i>	1	0,7
	Tổng	21	15,6
ETEC	<i>AstA, LT</i>	1	0,7
	<i>AstA, LT, StIa</i>	1	0,7
	<i>AstA, StIb</i>	1	0,7
	<i>LT, StIa</i>	1	0,7
	<i>StIb</i>	3	2,2
	Tổng	7	5,0
EAEC/EPEC	<i>aggR, bfp</i>	1	0,7
EAEC /DAEC	<i>AstA, daaD</i>	5	3,6
Tổng các chủng mang gen độc lực		63	46,0
<i>Không phát hiện</i>		74	54,0
Tổng		137	100,0

Trong nghiên cứu này chúng tôi phát hiện 46% chủng *E. coli* sinh ESBL mang các gen độc lực. Trong đó các chủng mang gen độc lực thuộc nhóm EAEC chiếm 21,1%, nhóm EPEC chiếm 15,6%, nhóm ETEC chiếm 5%. Có 6 chủng mang phôi hợp 2 gen của 2 nhóm, trong đó có 5 thuộc nhóm EAEC/DEAC và 1 chủng thuộc nhóm EAEC/EPEC.

Bảng 3.25. Tỷ lệ kháng đa thuốc của các chủng mang gen độc lực

<i>E. coli</i> gây tiêu chảy	Số lượng	Tỷ lệ (%)	p
EAEC (n=29) (1)	27	93,1	$p_{(4,1)} < 0,05$
EPEC (n=21) (2)	20	95,2	
EAEC/DAEC (n=5) (3)	5	100	$p_{(4,2)} < 0,05$
ETEC (n=6) (4)	3	50,0	$p_{(4,6)} < 0,05$
EAEC/EPEC (n=1) (5)	1	100	
Không phải <i>E. coli</i> gây tiêu chảy (n =74) (6)	67	90,55	

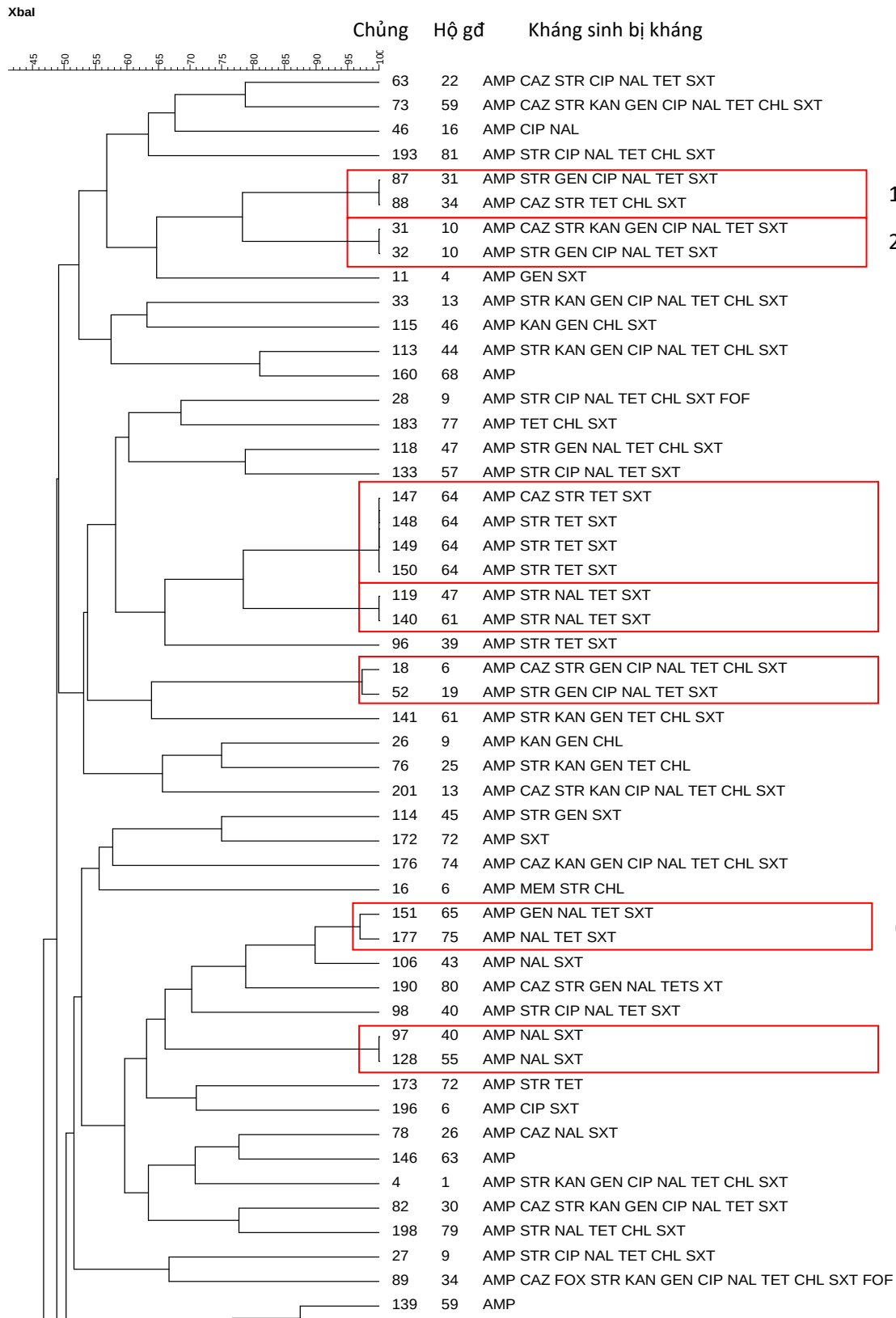
Kết quả ở bảng 3.25 cho thấy tất cả các chủng thuộc nhóm EAEC/DAEC và EAEC/EPEC đều là các chủng kháng đa thuốc. Các chủng EAEC, EPEC và các chủng không mang gen độc lực kháng thuốc với tỷ lệ cao (>90%). Các chủng mang gen độc lực thuộc nhóm ETEC có tỷ lệ kháng đa thuốc thấp nhất (50,0%).

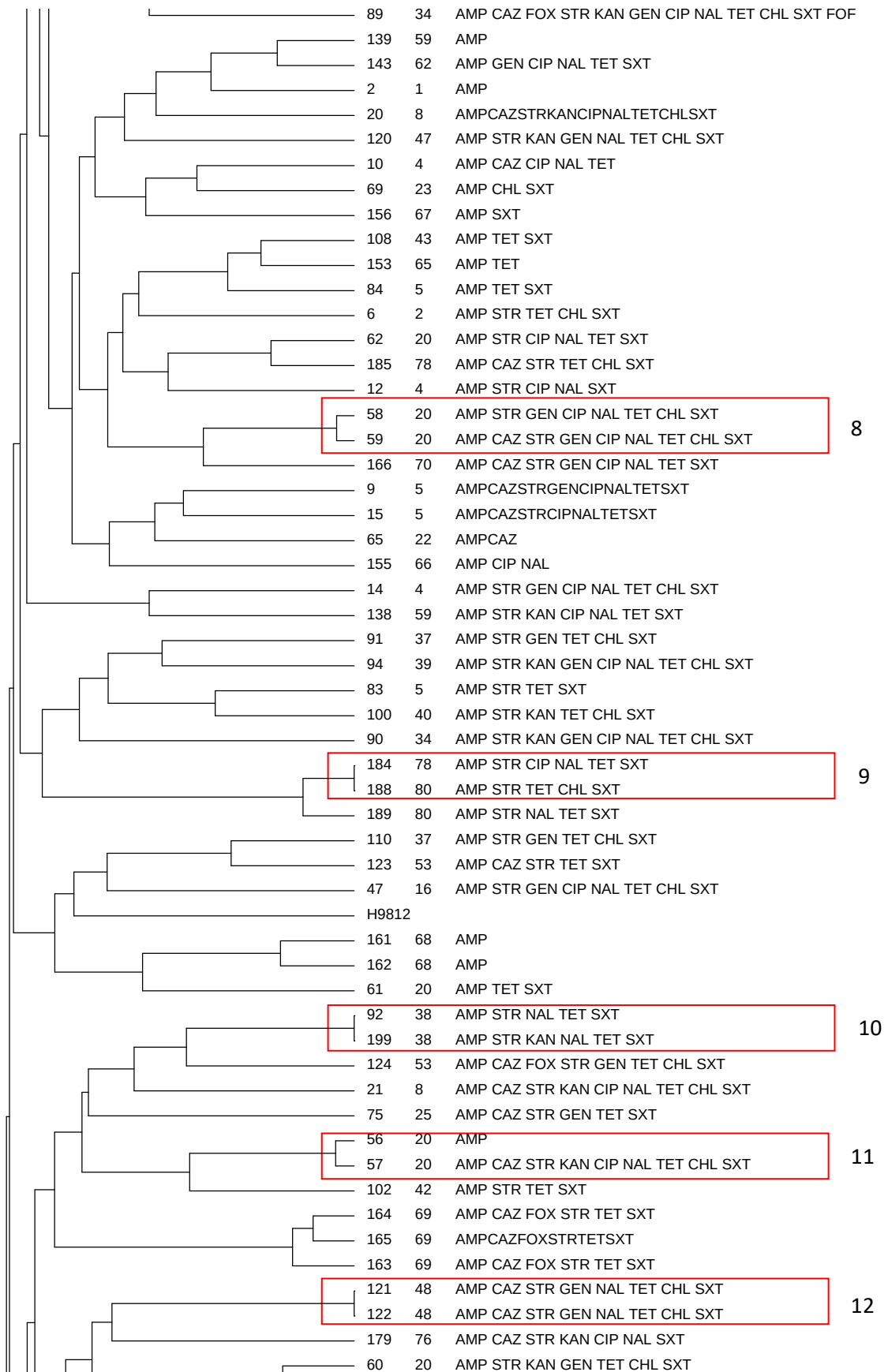
Bảng 3.26. Tỷ lệ mang gen độc lực của các nhóm phát sinh loài

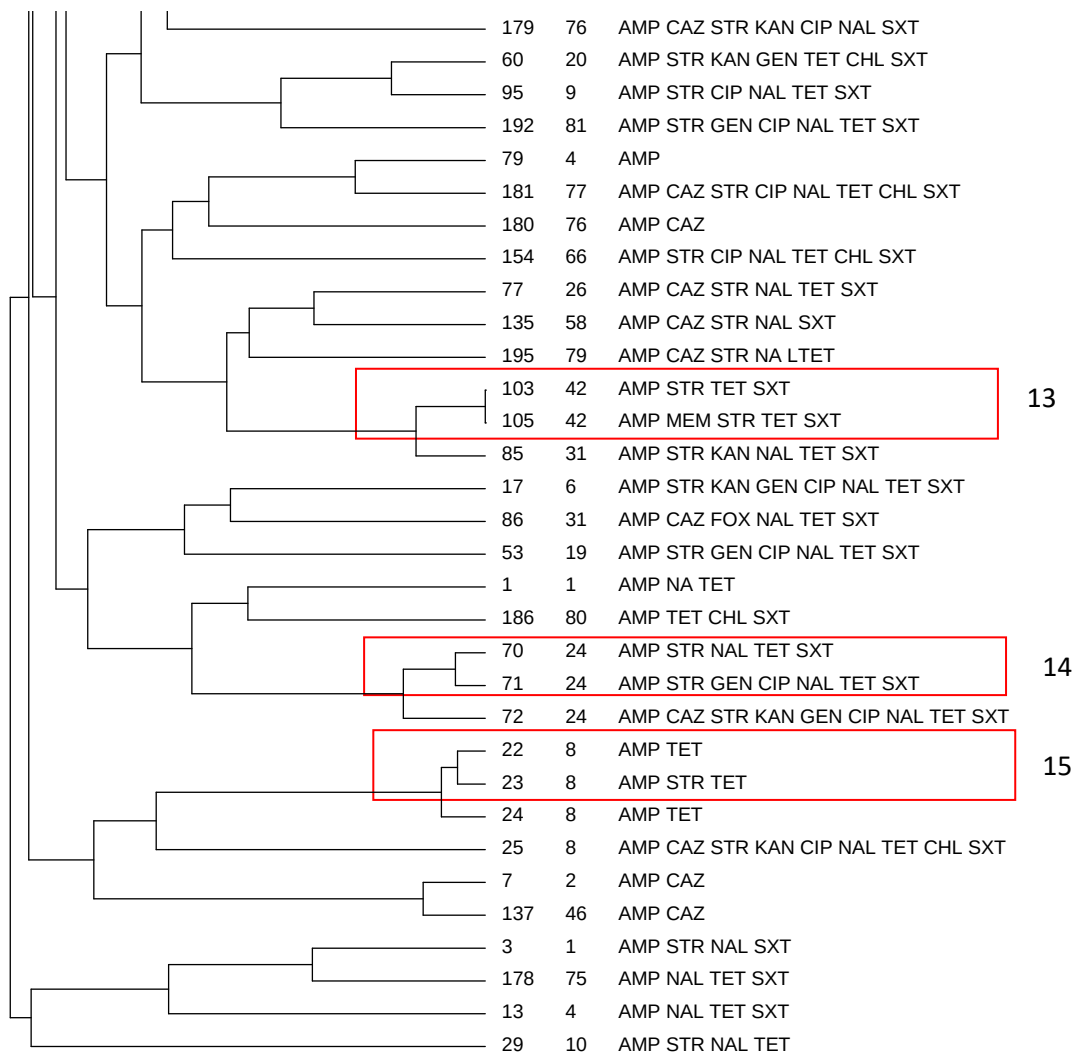
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	p
A (n=59)	24	40,6	>0,05
B1 (n=20)	11	55	
B2 (n=14)	8	57,1	
D (n=44)	20	45,5	
Tổng (n=137)	63	45,9	

Các chủng ở cả 4 nhóm phát sinh loài đều mang gen độc lực, trong đó tỷ lệ mang gen độc lực cao nhất ở nhóm B2 (57,1%), tiếp đến là nhóm B1 (55,0%), nhóm D (45,5%) và thấp nhất là nhóm A (40,6%). Tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

3.2.6. Mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng *E. coli* sinh ESBL

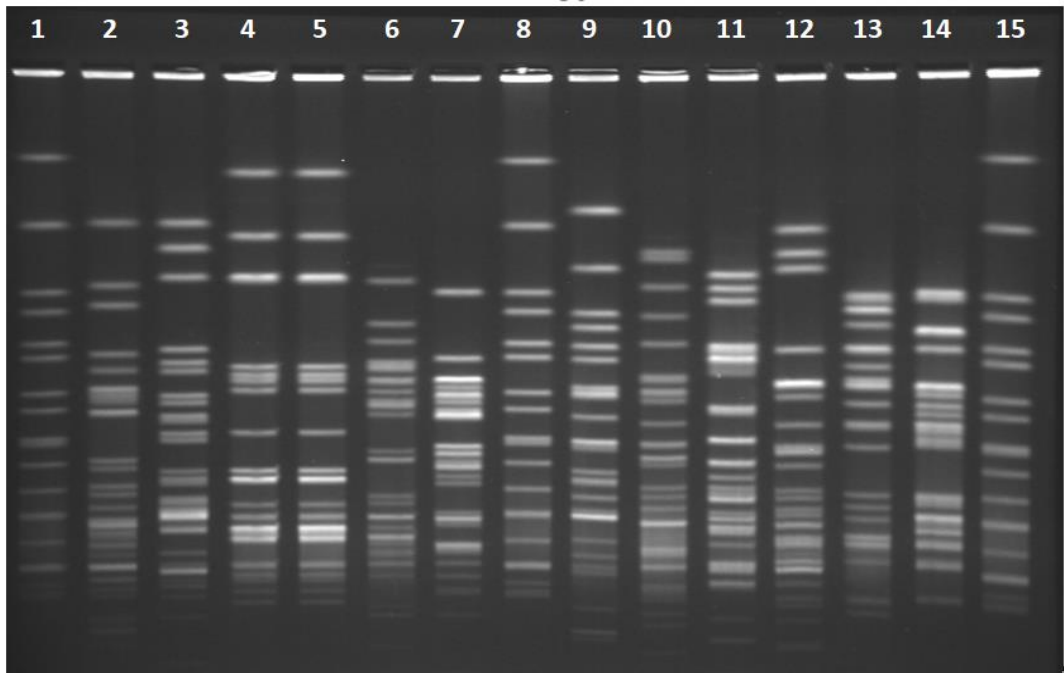






Hình 3.3. Cây phả hệ thể hiện mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng *E. coli* sinh ESBL phân lập được

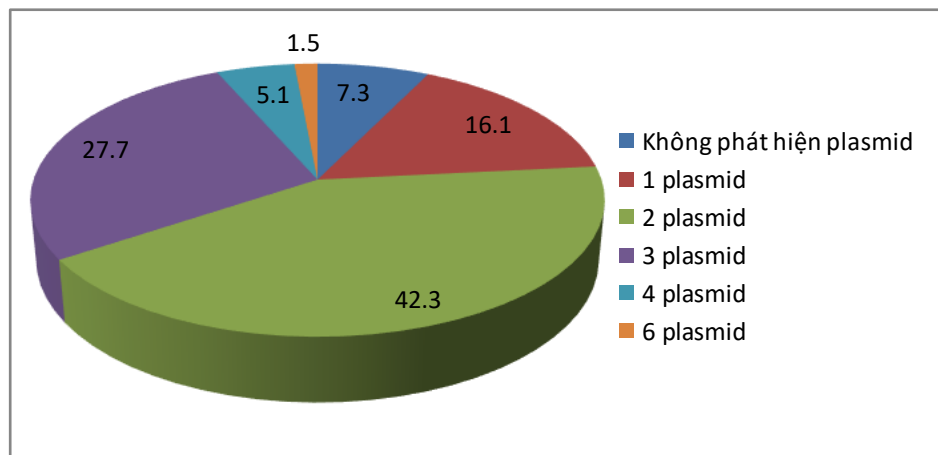
Trong tổng số 137 chủng *E. coli* sinh ESBL, có 4 chủng không phân loại được bằng PFGE. Kết quả PFGE của 133 chủng cho thấy: 73/133 (54,9%) chủng không có mối liên quan chặt chẽ về kiểu gen (mức tương đồng dưới 80%) và 28 (21,1%) chủng có mối liên quan gần về kiểu gen với mức tương đồng từ 80-95%. Đặc biệt chúng tôi phát hiện 32 chủng (24%) có mối liên quan rất chặt chẽ về kiểu gen với có mức tương đồng từ 95-100%, trong đó có 20 chủng tương đồng hoàn toàn về kiểu gen (tương đồng 100%).



Hình 3.4. Hình ảnh đại diện PFGE về mối liên hệ giữa các chủng *E. coli* sinh ESBL phân lập được trong nghiên cứu

Chú thích: 1, 8, 15: Thang D chuẩn *Salmonella enterica* serovar *Braenderup*). Các mẫu: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14

3.2.7. Phân tích đặc điểm plasmid của các chủng *E. coli* sinh ESBL



Biểu đồ 3.7. Số lượng các plasmid trong 1 chủng *E. coli* sinh ESBL

Trong 137 chủng nghiên cứu, chúng tôi phát hiện có 127 chủng (chiếm 92,7%) mang plasmid với tổng số 283 plasmid. Trên một chủng vi khuẩn có

thể mang từ 1-6 plasmid, trong đó phổ biến nhất là các chủng mang 2 plasmid (42,3%. Không phát hiện được plasmid ở 10/137 chủng.

Bảng 3.27. Tỷ lệ các loại plasmid trên các chủng *E. coli* sinh ESBL

Loại plasmid	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>B/O</i>	30	21,9
<i>FIC</i>	4	2,92
<i>A/C</i>	2	1,46
<i>P</i>	6	4,38
<i>T</i>	2	1,46
<i>FIIA</i>	2	1,46
<i>FIA</i>	34	24,82
<i>FIB</i>	78	56,93
<i>Y</i>	11	8,03
<i>K/B</i>	4	2,92
<i>I1</i>	13	9,49
<i>Frep</i>	71	51,82
<i>X</i>	6	4,38
<i>HI1</i>	5	3,65
<i>N</i>	5	3,65
<i>HI2</i>	6	4,38
<i>L/M</i>	4	2,92
<i>W</i>	0	0

Trong nghiên cứu này chúng tôi thấy sự xuất hiện các plasmid khá đa dạng (17/18 loại plasmid) ở các chủng *E. coli* sinh ESBL. Trong các plasmid được phát hiện thì FIB là plasmid là phổ biến nhất (56,93%), tiếp đến là Frep (51,82%), FIA (24,82%), B/O (21,9%), I1 (9,49%). Các plasmid khác như: FIC, A/, C, P, T, FIIA, Y, K/B, X, HI1, N, HI2, L/M được phát hiện với tỷ lệ thấp. Không phát hiện chủng nào mang plasmid W.

Bảng 3.28. Tỷ lệ xuất hiện các loại plasmid theo kiểu gen mã hóa sinh ESBL ở các chủng *E. coli* sinh ESBL

Loại plasmid	<i>blaCTX-M</i> (n=72)		<i>blaTEM</i> (n=5)		<i>blaCTX-M/TEM</i> (n=57)	
	n	%	n	%	n	%
B/O	22	30,6	1	20,0	7	12,3
FIC	2	2,8	1	20,0	1	1,8
A/C	2	2,8	0	0,0	0	0,0
P	4	5,6	0	0,0	2	3,5
T	0	0,0	0	0,0	2	3,5
FIIA	2	2,8	0	0,0	0	0,0
FIA	21	29,2	0	0,0	13	22,8
FIB	41	56,9	4	80,0	33	57,9
Y	2	2,8	0	0,0	9	15,8
K/B	3	4,2	0	0,0	1	1,8
I1	4	5,6	0	0,0	9	15,8
Frep	39	54,2	4	80,0	28	49,1
X	3	4,2	0	0,0	3	5,3
HI1	1	1,4	0	0,0	4	7,0
N	4	5,6	0	0,0	1	1,8
HI2	2	2,8	1	20,0	3	5,3
L/M	1	1,4	0	0,0	3	5,3

Kết quả ở bảng 3.28 cho thấy các chủng mang các gen kiểu gen *blaCTX-M*, *blaTEM* có thể có nhiều plasmid khác nhau. Đặc biệt các chủng mang kiểu gen *blaCTX-M/TEM* thì các mang hầu hết các loại plasmid.

Bảng 3.29. Phân bố số lượng plasmid theo kiểu gen mã hóa sinh ESBL

SL plasmid	<i>blaCTX-M</i> (n=72) (1)		<i>blaTEM</i> (n=5) (2)		<i>blaCTX-M/TEM</i> (n=57) (3)	
	n	%	n	%	n	%
0	8	11,1	0	0,0	2	3,5
1	11	15,3	0	0,0	11	19,3
2	21	29,2	4	80,0	32	56,1
3*	28	38,9	1	20,0	8	14,0
4	4	5,6	0	0,0	2	3,5
6	0	0,0	0	0,0	2	3,5
Tổng	72	100,0	5	100,0	57	100,0

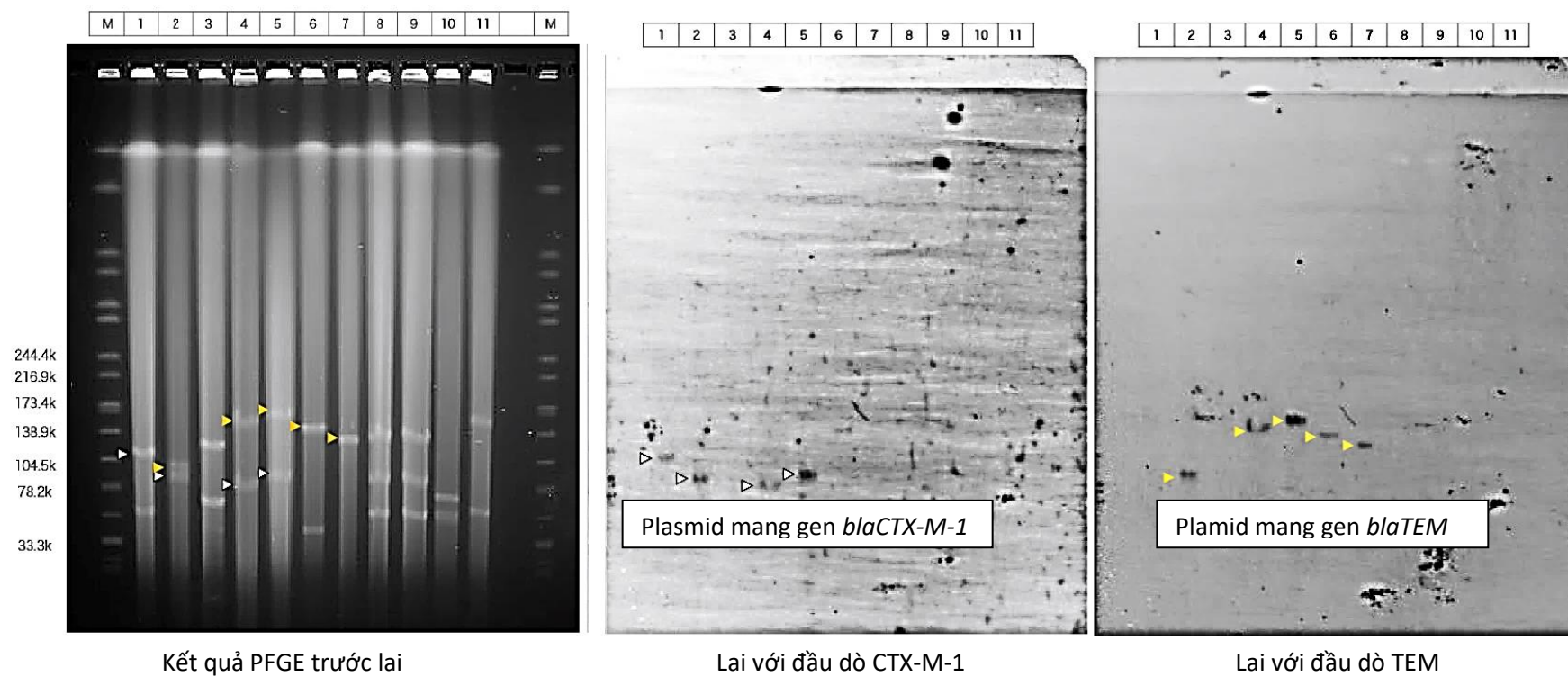
(*: $p_{1,3} < 0,05$)

Đánh giá sự phân bố số lượng plasmid theo kiểu gen mã hóa sinh ESBL của các chủng *E. coli* sinh ESBL chúng tôi nhận thấy: ở các chủng mang kiểu gen *blaCTX-M* thì tỷ lệ mang 3 plasmid chiếm ưu thế, trong khi ở các chủng mang kiểu gen *blaTEM* hoặc mang kiểu gen *blaCTX-M/TEM* thì chủ yếu là mang 2 plasmid. Các chủng mang 6 plasmid chỉ xuất hiện ở các chủng mang kiểu gen *blaCTX-M/TEM*.

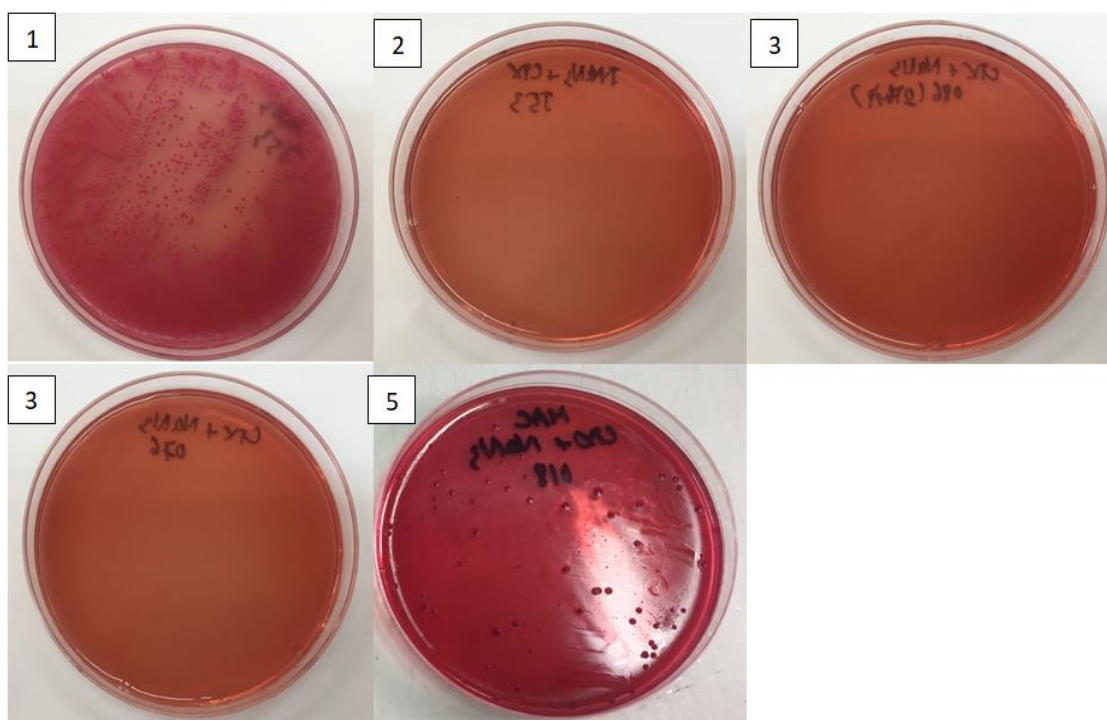
Kết quả Southern Blot với 37 chủng *E. coli* sinh ESBL được chọn ngẫu nhiên từ 137 chủng *E. coli* sinh ESBL cho thấy: 25/37 chủng (67,6%) có các plasmid mang các gen mã hóa sinh ESBL. Tỷ lệ phát hiện các plasmid chứa gen *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-9* và *blaTEM* ở các chủng *E. coli* sinh ESBL lần lượt là 36,4%, 76% và 75%. Trong 7 chủng mang đồng thời 2 gen mã hóa sinh ESBL, chúng tôi phát hiện có 2 chủng mang cả 2 gen mã hóa sinh ESBL trên cùng 1 plamid trong khi ở 5 chủng còn lại 2 gen mã hóa sinh ESBL nằm trên 2 plasmid khác nhau.

Bảng 3.30. Kết quả lai Southern Blot

Tên chủng	Gen mã hóa ESBL	Plasmid mang <i>blaCTX-M-9</i> (n = 25)	Plasmid mang <i>blaCTX-M-1</i> (n = 11)	Plasmid mang <i>blaTEM</i> (n = 12)
7	<i>blaCTX-M-1</i>		+	
9	<i>blaCTX-M-1/TEM</i>		+	+
10	<i>blaCTX-M-1</i>		-	
20	<i>blaCTX-M-1/TEM</i>		+	+
25	<i>blaCTX-M-1/TEM</i>		+	+
73	<i>blaCTX-M-1/TEM</i>		-	+
77	<i>blaCTX-M-1/TEM</i>		-	+
79	<i>blaCTX-M-1</i>		-	
82	<i>blaCTX-M-1/TEM</i>		-	-
89	<i>blaCTX-M-1/TEM</i>		-	-
121	<i>blaCTX-M-1</i>		-	
18	<i>blaCTX-M-9</i>	-		
22	<i>blaCTX-M-9</i>	-		
23	<i>blaCTX-M-9</i>	-		
31	<i>blaCTX-M-9</i>	-		
56	<i>blaCTX-M-9</i>	-		
62	<i>blaCTX-M-9</i>	-		
71	<i>blaCTX-M-9/TEM</i>	+		+
75	<i>blaCTX-M-9/TEM</i>	+		+
87	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
97	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
103	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
106	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
108	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
114	<i>blaCTX-M-9/TEM</i>	+		+
119	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
120	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
128	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
139	<i>blaCTX-M-9/TEM</i>	+		+
147	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
148	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
149	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
156	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
161	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
163	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
164	<i>blaCTX-M-9</i>	+		
199	<i>blaTEM</i>			-
Tổng		19 (76%)	4 (36,4%)	9 (75%)



Hình 3.5. Kết quả đại diện lai Southern Blot



Hình 3.6. Kết quả đại diện truyền plasmid mang các gen mã hóa sinh ESBL từ chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL sang chủng *E. coli* J53.

Chú thích: 1. *E. coli* J53 trên thạch MacConkey có NaN3

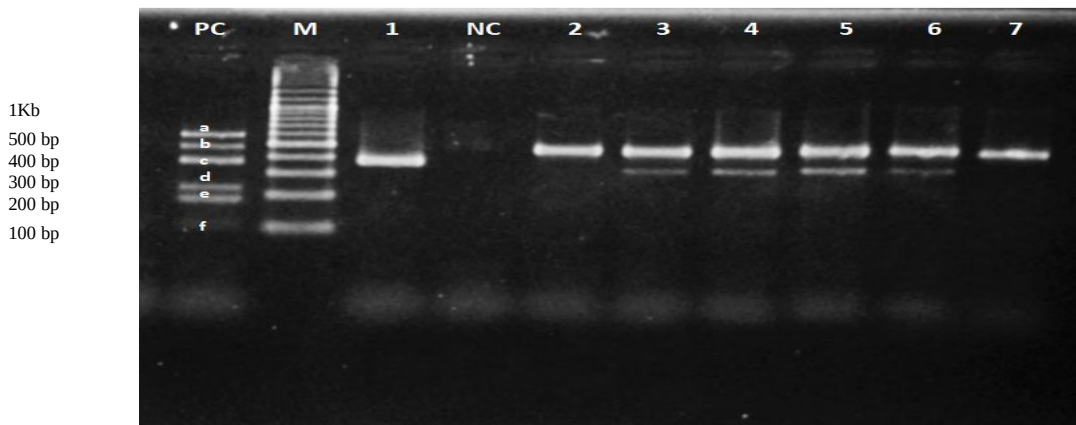
2. *E. coli* J53 không mọc trên thạch MacConkey có NaN3 và cefotaxim

3. Chủng *E. coli* sinh ESBL trước khi truyền plasmid không mọc trên thạch MacConkey có NaN3 và cefotaxim

4. Kết quả sau khi truyền không thành công plasmid mang gen mã hóa sinh ESBL của chủng *E. coli* sinh ESBL sang *E. coli* J53 trên thạch MacConkey có NaN3 và cefotaxim

5. Kết quả sau khi truyền thành công plasmid mang gen mã hóa sinh ESBL của chủng *E. coli* sinh ESBL sang *E. coli* J53 trên thạch MacConkey có NaN3 và cefotaxim

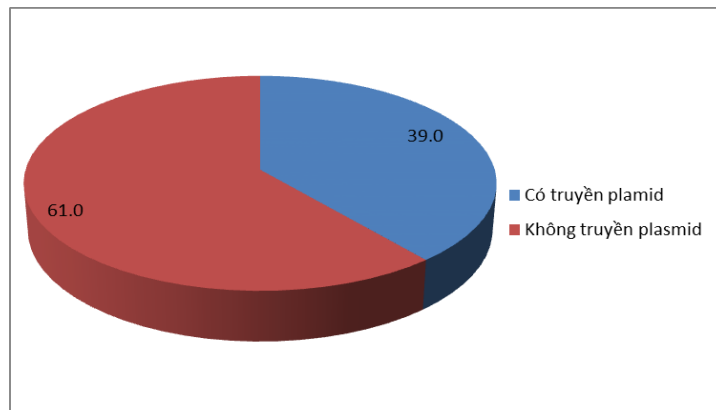
Kết quả tại hình 3.6 cho thấy sau khi tiếp hợp ở một số đĩa môi trường MacConkey có chứa cefotaxime và NaN3 xuất hiện khuẩn lạc *E. coli* J53 có màu đỏ tươi mọc. Đây có lẽ là các chủng J53 đã nhận các plasmid kháng cefotaxim từ các chủng *E. coli* sinh ESBL cho. Để kiểm tra khả năng truyền các plasmid chứa các gen mã hóa sinh ESBL từ các chủng *E. coli* sinh ESBL sang chủng *E. coli* J53 chúng tôi tiến hành xác định sự có mặt của gen *blaCTX-M-9*, *blaCTX-M-1* và *blaTEM* ở các chủng J53 mọc trên môi trường MacConkey có chứa cefotaxime và NaN3 bằng kỹ thuật PCR đa môi.



Hình 3.7. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR sau khi tiếp hợp

Chú thích: M: Marker 100 bp, PC: Chứng dương (a: CTX-M-1 (588bp), b: CTX-M-9 (475bp), c: TEM (372bp), d: SHV (231bp), e: CTX-M-8/25 (186bp), f: CTX-M-2 (107bp)), NC: Chứng âm, 1-7: các chủng sau tiếp hợp.

Kết quả kiểm tra bằng PCR đa môi cho thấy, sau tiếp hợp các khuẩn lạc *E. coli* J53 mọc trên môi trường MacConkey có chứa cefotaxime và NaN₃ có mang gen *bla*CTX-M-9, *bla*CTX-M-1 và *bla*TEM. Điều này cho thấy nhóm nghiên cứu đã truyền thành công plasmid mang các gen mã hóa sinh ESBL sang *E. coli* J53 trong mô hình phòng thí nghiệm (hình 3.7).



Biểu đồ 3.8. Tỷ lệ truyền plasmid mang gen mã hóa sinh ESBL ở các chủng *E. coli* sinh ESBL sang *E. coli* J53

Kết quả thử nghiệm của chúng tôi cho thấy 16/41 (39 %) chủng *E. coli* sinh ESBL phân lập trên mẫu phân người khỏe mạnh có khả năng truyền

plasmid mang gen mã hóa sinh ESBL sang chủng *E. coli* J53 ở mô hình phòng thí nghiệm.

Bảng 3.31. Tỷ lệ truyền plasmid mang gen *blaCTX-M-9*, *blaCTX-M-1*, *blaTEM* sang *E. coli* J53

Gen	Số lượng	Tỷ lệ (%)	p
<i>blaCTX-M-9</i> (n=31)	14	45,2	> 0,05
<i>blaCTX-M-1</i> (n=10)	2	20,0	
<i>blaTEM</i> (n=20)	5	25,0	

Kết quả của chúng tôi ở bảng 3.30 cho thấy các chủng *E. coli* sinh ESBL trong thử nghiệm có khả năng truyền plasmid mang các gen *blaCTX-M-9*, *blaCTX-M-1* và *blaTEM* sang cho *E. coli* J53. Trong đó khả năng truyền plasmid mang gen *blaCTX-M-9* chiếm tỷ lệ cao nhất (45,2%), tiếp đến là plasmid mang gen *blaTEM* (25%) và thấp nhất là plasmid mang gen *blaCTX-M-1* (20,0%). Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$

Bảng 3.32. Số lượng gen có thể truyền trên các chủng mang đồng thời 2 gen mã hóa sinh ESBL

Số chủng <i>E. coli</i> sinh ESBL	Số lượng	Tỷ lệ
Truyền cả 2 gen	5	25,0 %
Truyền 1 gen	2	10,0 %
Không truyền	13	65,0
Tổng	20	100

Trong 41 chủng được sử dụng làm thử nghiệm tiếp hợp có 20 chủng mang đồng thời 2 gen mã hóa sinh ESBL. Kết quả thử nghiệm của chúng tôi cho thấy có 7 chủng xảy ra hiện tượng tiếp hợp, trong đó 5/20 (25,0 %) chủng có thể truyền được plasmid của cả 2 gen.

Chương 4: BÀN LUẬN

4.1. Sự lưu hành của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh tại cộng đồng nông thôn tỉnh Thái Bình.

4.1.1. Đặc điểm của đối tượng xét nghiệm

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành xét nghiệm 212 người gồm 101 nam, 111 nữ thuộc 59 hộ gia đình ở xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình. Các đối tượng xét nghiệm này có độ tuổi trung bình là $40,14 \pm 23,08$ tuổi, cao nhất là 89 tuổi và thấp nhất là 1 tuổi (bảng 3.1). Các đối tượng ở nhóm tuổi 50-59 có tỷ lệ cao nhất (17,9%) và nhóm tuổi 80-89 có tỷ lệ thấp nhất (4,2%), các nhóm tuổi còn lại có phân bố tương đối đồng đều với tỷ lệ dao động từ 6,6% đến 14,6% (bảng 3.2).

Các đối tượng tham gia nghiên cứu của chúng tôi sống trong 59 hộ gia đình, với số thành viên trung bình trong 1 hộ gia đình là 3,59 người, cao nhất là 7 người, thấp nhất là 2 người (bảng 3.1). Trong đó phổ biến nhất là các gia đình có từ 3 người (30,5%) và 4 người (25,4%). Các gia đình có 2 thành viên và từ 5 thành viên trở lên chiếm tỷ lệ thấp (bảng 3.3).

Về trình độ học vấn, phần lớn những người tham gia nghiên cứu có trình độ trung học cơ sở (50%) và trung học phổ thông (25%), trình độ từ trung cấp trở lên và trình độ tiểu học (bao gồm học sinh tiểu học và người già) chiếm tỷ lệ thấp với tỷ lệ lần lượt là 9,0 và 9,9%. Ngoài ra trong nghiên cứu này có 6,1% đối tượng là các trẻ em dưới 6 tuổi chưa biết chữ (bảng 3.4).

Phân tích đặc điểm về nghề nghiệp của những người tham gia nghiên cứu chúng tôi nhận thấy nghề nghiệp phổ biến nhất là làm ruộng (43,6%), tiếp đến là học sinh, sinh viên (20,2%) và công nhân (10,8%). Các nghề khác như thủ công, hưu trí, cán bộ, buôn bán chiếm tỷ lệ thấp (bảng 3.5).

4.1.2. Sự lưu hành của *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh

Hiện nay tình trạng nhiễm *E. coli* sinh ESBL xảy ra ở khắp nơi trên thế giới, đặc biệt ở khu vực châu Á tỷ lệ lưu hành *E. coli* sinh ESBL tương đối cao (38,2%). Trong đó tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL trong các nhiễm khuẩn tại bệnh viện cao nhất ở Trung Quốc (66,6%) Thái Lan (49,8%) và Việt Nam (47,9%); tỷ lệ này trong các nhiễm khuẩn tại cộng đồng ở Trung Quốc, Hàn Quốc, Thái Lan và Việt Nam là trên 20% [41].

Trong nghiên cứu này, bước đầu nhằm sàng lọc các vi khuẩn sinh ESBL, chúng tôi nuôi cấy mẫu phân của 212 người khỏe mạnh tại cộng đồng xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư trên môi trường MacConkey có bổ sung CTX 1µg/ml. Kết quả cho thấy có tới 92,9 % các mẫu phân có vi khuẩn kháng CTX mọc, trong đó 79,7% là *E. coli*, 13,2% không phải là *E. coli*. Chỉ có 7,1% các mẫu phân không thấy có vi khuẩn đường ruột kháng CTX (bảng 3.6). Điều này cho thấy tỷ lệ mang vi khuẩn kháng CTX, đặc biệt là *E. coli* ở đường ruột của những người tham gia nghiên cứu chiếm tỷ lệ rất cao mặc dù các đối tượng này không có tiền sử dùng kháng sinh trong 3 tháng trước đó.

Kết quả xác định *E. coli* sinh ESBL cho thấy trong 212 người tham gia xét nghiệm thì có 137 người (64,6%) mang *E. coli* sinh ESBL (bảng 3.7). Tỷ lệ này cao hơn so với tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL trong các bệnh viện trên thế giới trong thời gian gần đây tại Hy Lạp (20,2%) [117], tại Bỉ (11,6%) [110] và tại Mỹ 2014 (11,8%) [30]. Hơn nữa tỷ lệ này cao hơn rất nhiều so với các nghiên cứu tại cộng đồng người khỏe mạnh ở một số nước châu Âu như Thụy Sĩ (5.5%) [51], Pháp (6.0%) [99] và Đức (6.3%) [118]. Mặt khác tỷ lệ này cũng cao hơn so với các nghiên cứu được thực hiện tại các bệnh viện lớn ở Việt Nam trong các giai đoạn trước đó như: Bệnh viện Bạch Mai (42,2%) [7], bệnh viện Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh (32,3%)[6],

bệnh viện 103 Hà Nội (32,43%) [18], bệnh viện Bình Dân, thành phố Hồ Chí Minh (29,22%) [11], bệnh viện Đa khoa Trung Ương Thái Nguyên (39,53%) [21]. Tuy nhiên tỷ lệ này tương đương với kết quả một số nghiên cứu công bố gần đây tại bệnh viện ở một số nước châu Á như: Trung Quốc (66,6%), Thái Lan (49,8), Việt Nam (47,9%) [41] và một số nghiên cứu trên người khỏe mạnh tại cộng đồng ở một số nước châu Á như Trung Quốc (50,5%) [78], Thái Lan (61,7%) [109] và Việt Nam (Thái Bình (66,7%) [5], thành phố Hồ Chí Minh (63,1%) [16]). Điều này cho thấy *E. coli* sinh ESBL đang lưu hành ở Việt Nam và châu Á với tỷ lệ khá cao không chỉ trong bệnh viện mà còn trong cộng đồng. Hơn nữa vi khuẩn này đang có xu hướng gia tăng ở khu vực này trong những năm gần đây. Tình trạng sử dụng kháng sinh không hợp lý của người dân trong điều trị và trong chăn nuôi là một trong những nguyên nhân dẫn đến sự xuất hiện và gia tăng các vi khuẩn kháng thuốc. Thêm nữa, Thái Bình là một tỉnh nông nghiệp, người dân nơi đây vẫn còn thói quen sử dụng phân người và gia súc trong trồng trọt và chăn nuôi. Trong điều kiện nhiệt đới của nước ta, vi khuẩn sinh ESBL tồn tại trong phân rất dễ tồn tại và sinh sôi nảy nở trong môi trường, làm tăng nguy cơ nhiễm ESBL cho cộng đồng. Mặt khác tình trạng nhiễm *E. coli* sinh ESBL trong thực phẩm ở khu vực này khá cao (68,4%) [57]. Đây có lẽ cũng là nguồn quan trọng làm cho tình trạng nhiễm *E. coli* sinh ESBL ở người khỏe mạnh ở đây rất cao.

Hơn nữa, trong nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy tỷ lệ sinh ESBL ở các chủng *E. coli* kháng CTX chiếm tỷ lệ rất cao (81,1%) (bảng 3.7). Tỷ lệ này tương đương với tỷ lệ sinh ESBL ở các chủng *E. coli* kháng cephalosporin được công bố trong một nghiên cứu ở 30 nước châu Âu [115]. Qua đó cho thấy có lẽ cơ chế chính trong kháng cephalosporin thế hệ 3 của các chủng *E. coli* là do sinh các men ESBL làm bất hoạt các kháng sinh nhóm này.

Phân tích về độ tuổi của những người khỏe mạnh mang *E. coli* sinh

ESBL, chúng tôi nhận thấy: những người mang *E. coli* sinh ESBL nằm trong độ tuổi từ 1 đến 86. Các đối tượng thuộc nhóm tuổi 50-59 có tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL cao nhất (81,6%), tỷ lệ này thấp nhất (52%) ở nhóm tuổi 60-69. Tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL ở nhóm tuổi 50-59 cao hơn hẳn so với tỷ lệ này ở các nhóm tuổi 30-39, 40-49 và 60-69 (với $p < 0,05$) (bảng 3.8).

Khi phân tích đặc điểm về giới tính của các đối tượng mang *E. coli* sinh ESBL, chúng tôi nhận thấy: Trong 111 nữ tham gia xét nghiệm thì có 72 người mang *E. coli* sinh ESBL, chiếm 64,9%. Trong 101 đối tượng nghiên cứu là nam thì tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL là 64,6%. Sự phân bố về tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL giữa 2 giới là tương đương nhau với $p > 0,05$ (bảng 3.9). Kết quả này của chúng tôi cũng tương tự như nghiên cứu của Nguyễn Đỗ Phúc trên người khỏe mạnh tại Thành phố Hồ Chí Minh [15].

Trong 59 hộ gia đình tham gia nghiên cứu, 55 hộ (93,2%) có người mang *E. coli* sinh ESBL. Số người mang *E. coli* sinh ESBL trong 1 hộ gia đình dao động từ 1 đến 7 người, trong đó số hộ gia đình có 2 người mang *E. coli* sinh ESBL chiếm tỷ lệ cao nhất (42,4%), tiếp đến là các hộ gia đình có 3 người mang (18,6%) và 1 người mang (16,9%). Các hộ gia đình có từ 4 người mang *E. coli* sinh ESBL trở lên chiếm tỷ lệ thấp (bảng 3.10).

Phân tích về tỷ lệ các thành viên trong các hộ gia đình mang *E. coli* sinh ESBL chúng tôi nhận thấy: Số hộ gia đình có tất cả các thành viên mang *E. coli* sinh ESBL chiếm tỷ lệ cao nhất (35,6%), tiếp đến là các hộ gia đình có từ 60 đến dưới 100% số thành viên trong gia đình mang (27,1%). Các hộ gia đình có 30 - 60% thành viên mang chiếm tỷ lệ 22,0% và chỉ có 8,5% các hộ gia đình có số người mang dưới 30% các thành viên (bảng 3.11). Điều này cho thấy có thể có sự lây lan vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL cho nhau giữa các thành viên trong cùng hộ gia đình bởi lẽ các thành viên trong cùng hộ gia đình

dùng chung nguồn thức ăn, nước uống, có chung các điều kiện môi trường trong sinh hoạt hàng ngày như nguồn nước dùng trong sinh hoạt, nhà vệ sinh. Đây là những điều kiện phù hợp với các con đường lây truyền của *E. coli* là thông qua thức ăn, nguồn nước bị ô nhiễm, tiếp xúc với người bị nhiễm.

Phân tích tỷ lệ nhiễm *E. coli* sinh ESBL theo trình độ học vấn chúng tôi nhận thấy những người có trình độ tiểu học có tỷ lệ nhiễm *E. coli* sinh ESBL thấp hơn so với các nhóm khác. Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ (bảng 3.12).

Trong các đối tượng tham gia xét nghiệm, tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL cao nhất ở nhóm cán bộ (77,8%), tiếp đến là nhóm làm nghề thủ công (76,9%), học sinh sinh viên (65,1%), làm ruộng (63,0%), buôn bán (62,5%), trẻ nhỏ (61,5%) và thấp nhất là cán bộ hưu (45,5%). Tuy nhiên không có khác biệt về tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL giữa những người có nhóm nghề nghiệp khác nhau, với $p > 0,05$ (bảng 3.13).

4.2. Đặc điểm sinh học của các chủng *E. coli* sinh ESBL

4.2.1. Đặc điểm sinh vật, hóa học của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Trong nghiên cứu này chúng tôi định danh vi khuẩn *E. coli* bằng tính chất sinh vật, hóa học sử dụng các môi trường TSI, CLIG, LIM. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tất cả các chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL đều có khả năng lên men glucose, lên men lactose hoặc sucrose, không sinh H_2S , không lên men cellobiose. Hầu hết các vi khuẩn đều có khả năng sinh indol và sinh khí gas (>94%). Phần lớn các chủng có lên men đường lactose (88,3%), decarboxylase lysine (80,3%), thủy phân β – glucuronidase (78,8%) và khả năng di động (77,4%) (bảng 3.14)

4.2.2. Đặc điểm kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Hiện tượng vi khuẩn kháng kháng sinh đang ngày một gia tăng ở khắp các châu lục. Vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL là một tác nhân được báo cáo kháng

lại nhiều thuốc kháng sinh với tỷ lệ cao ở nhiều nơi trên thế giới, đặc biệt là khu vực châu Á và châu Mỹ La tinh. Nghiên cứu ở khu vực châu Á-Thái Bình Dương cho thấy tỷ lệ kháng của các chủng *E. coli* sinh ESBL với các kháng sinh cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone và ciprofloxacin ở khu vực này là trên 70 %. Đặc biệt là mức độ kháng với các cephalosporin như cefepime, cefotaxime, ceftazidime và ceftriaxone của các chủng *E. coli* sinh ESBL cao hơn rất nhiều so với vi khuẩn không sinh ESBL [61]. Tại khu vực Mỹ La-tinh, tỷ lệ kháng của các chủng *E. coli* sinh ESBL phân lập từ bệnh nhân nhiễm khuẩn ổ bụng với các kháng sinh như cefepime, cefotaxim và ceftriaxon là trên 90%, trong khi tỷ lệ này ở nhóm *E. coli* không sinh ESBL là dưới 5%, vi khuẩn này còn kháng các kháng sinh nhóm khác như ceftazidime, ciprofloxacin và levofloxacin với tỷ lệ cao [121].

Việt Nam là một trong số các nước có tình hình kháng kháng sinh ở mức đáng lo ngại. Nhiều nghiên cứu cho thấy các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL được phân lập tại các bệnh viện đã kháng ampicillin, và các kháng sinh cephalosporin thế hệ 3 với tỷ lệ rất cao (>90%) [14, 19, 23, 116]. Ngoài khả năng kháng các kháng sinh thuộc họ β -lactam, hầu hết các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL thường kháng đồng thời với các kháng sinh thuộc các nhóm khác như aminoglycosides, fluoroquinolones, quinolones và tetracycline gây nên hiện tượng đồng kháng nhiều loại kháng sinh, do đó hầu hết các chủng *E. coli* sinh ESBL là các chủng kháng đa thuốc với khả năng kháng lại ít nhất ba nhóm kháng sinh, trong đó phổ biến là các chủng kháng lại 6-8 kháng sinh [18, 19]. Các chủng sinh ESBL kháng đồng thời nhiều kháng sinh đang gia tăng qua các năm (8,33% - 15,38% năm 2008, 18,75% - 25,0% năm 2009 [18]. Các chủng *E. coli* sinh ESBL cũng được báo cáo có khả năng kháng kháng sinh cao hơn so với các chủng không sinh ESBL [14, 18, 19, 23, 116].

Tương tự như các nghiên cứu trên, nghiên cứu của chúng tôi cũng ghi nhận *E. coli* sinh ESBL đã kháng lại với hầu hết các nhóm kháng sinh thông dụng hiện nay với tỷ lệ tương đối cao: 100% các chủng kháng với AMP. Tỷ lệ kháng với SXT và TET đều cao, lần lượt là 81,0% và 77,4%. Trong nhóm aminoglycosides, tỷ lệ kháng cao nhất là STR (67,9%), tiếp theo là GEN (32,1%) và KAN (21,2%). Vi khuẩn này kháng khá cao với các kháng sinh nhóm quinolone như NAL (56,9%), CIP (37,2%) . Tỷ lệ kháng với CHL cũng khá cao 34,3%. Tuy nhiên, các chủng vi khuẩn này vẫn còn nhạy cảm với một số kháng sinh như FOX, FOF và MEM (tỷ lệ kháng lần lượt là 4,4%; 1,5% và 1,5%) (bảng 3.15). *E. coli* là vi khuẩn chủ yếu (chiếm 70-80%) gây nhiễm trùng tiết niệu. Với tình trạng vi khuẩn *E. coli* kháng thuốc đang ngày càng phổ biến như hiện nay, việc điều trị bằng kháng sinh chỉ hiệu quả khi có kết quả kháng sinh đồ. Tuy nhiên, tại Việt Nam, chỉ có các bệnh viện tuyến trung ương hoặc bệnh viện lớn tuyến tỉnh mới có khả năng nuôi cấy, định danh và xác định độ nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn. Do không thể thực hiện được các xét nghiệm vi sinh, kháng sinh đồ nên việc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn ở tuyến y tế cơ sở chủ yếu dựa vào phác đồ kinh nghiệm. Theo hướng dẫn của Hiệp hội bệnh truyền nhiễm Hoa Kỳ và Hiệp hội vi sinh và bệnh truyền nhiễm châu Âu [56], nếu điều trị theo phác đồ kinh nghiệm thì không nên sử dụng các kháng sinh có tỷ lệ kháng trên 10%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy các kháng sinh thường sử dụng trong điều trị nhiễm trùng tiết niệu tại Việt Nam như AMP, CTX, CAZ, CIP, GEN, SXT [4] sẽ không thể áp dụng với phác đồ kinh nghiệm trong điều trị nhiễm trùng tiết niệu. Mặc dù vậy, hầu hết các chủng *E. coli* sinh ESBL trong nghiên cứu này vẫn còn nhạy cảm với MEM, FOF và FOX (tỷ lệ kháng dưới 5%) (bảng 3.14). Tuy nhiên, theo hướng dẫn của Bộ Y tế, thì FOF và FOX là 2 loại kháng sinh không được đưa vào phác đồ điều trị các trường hợp nhiễm trùng tiết niệu [4] chúng

tôi cho rằng cần phải nghiên cứu đánh giá hiệu quả của các kháng sinh này trong điều trị nhiễm trùng tiết niệu do *E. coli* sinh ESBL vì các kháng sinh này có thể là những lựa chọn hiệu quả hơn so với các kháng sinh thường sử dụng trong phác đồ điều trị nhiễm trùng tiết niệu của Bộ Y tế đã đưa ra.

Kết quả ở biểu đồ 3.1 cho thấy tất cả các chủng *E. coli* sinh ESBL đều kháng ít nhất 1 nhóm kháng sinh, phần lớn các chủng này kháng từ 3 đến 9 kháng sinh, đặc biệt có chủng kháng tới 12 trong số 13 kháng sinh được thử nghiệm. Hơn nữa kết quả đánh giá mức độ kháng đa thuốc cho thấy 86,1% số chủng *E. coli* sinh ESBL là các chủng kháng đa thuốc (không nhạy cảm với 3 nhóm kháng sinh trở lên), trong đó không nhạy cảm với 5 và 6 nhóm kháng sinh chiếm ưu thế với tỷ lệ lần lượt là 26,3% và 22,6%. Ngoài ra, chúng tôi còn phát hiện 1 chủng (0,7%) không nhạy cảm với 9 nhóm kháng sinh trong số 10 nhóm kháng sinh thử nghiệm (bảng 3.15). Chủng này có khả năng là các chủng XDR và để khẳng định thì cần phải tiếp tục thử nghiệm với 7 nhóm kháng sinh khác theo hướng dẫn của Magiorakos [113]. So sánh với kết quả nghiên cứu của Donk (2012) [120] tại 3 nước Hà Lan, Đức và Bỉ cho thấy tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL kháng đa thuốc (MDR) lần lượt là 11%, 17% và 27%, tỷ lệ này thấp hơn nhiều so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Sự khác biệt này có lẽ là do tình trạng sử dụng lạm dụng kháng sinh ở Việt Nam diễn ra phổ biến. Mặc dù đã có qui định về kê đơn và bán thuốc theo đơn, người bệnh vẫn có thể mua thuốc kháng sinh và nhiều loại thuốc khác trực tiếp từ các nhà thuốc và các quầy thuốc bán lẻ. Tự điều trị là tình trạng khá phổ biến, mặc dù tự chẩn đoán thường rất thiếu chính xác [7]. Mặt khác do thiếu kiến thức về sử dụng kháng sinh hợp lý, nhiều người dân sử dụng kháng sinh mà không tuân thủ chặt chẽ hướng dẫn về thời gian và liều lượng dùng thuốc kháng sinh [7]. Đây có lẽ cũng là nguyên nhân quan trọng gây nên tình trạng kháng đa thuốc ở vi khuẩn. Vì vậy cần có những

biện pháp để quản lý việc sử dụng kháng sinh một cách hợp lý trong cả bệnh viện và cộng đồng để hạn chế tình trạng kháng kháng sinh, đặc biệt là kháng đa thuốc ngày càng gia tăng trong cộng đồng.

4.2.3. Đặc điểm các gen mã hóa sinh ESBL ở các chủng *E. coli* sinh ESBL

Hiện nay đã có hơn 600 biến thể enzyme ESBL khác nhau được phát hiện, tương ứng sẽ có hơn 600 kiểu gen mã hóa sinh ESBL khác nhau. Trong đó, đối với họ gen *blaCTX-M* có hơn 100 biến thể khác nhau được xếp vào 5 nhóm gồm: *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-2*, *blaCTX-M-8*, *blaCTX-M-9* và *blaCTX-M-25*; còn lại các biến thể khác chủ yếu thuộc kiểu gen họ *blaTEM* và *blaSHV* [32, 101].

Trước đây *blaSHV* và *blaTEM* là hai nhóm gen mã hóa ESBL phổ biến nhất ở vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL. Tuy nhiên trong những năm gần đây nhóm gen *blaCTX-M* đang trở nên chiếm ưu thế [32, 55, 74, 101]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ các chủng mang nhóm gen *blaCTX-M* (94,1%) cao hơn so với tỷ lệ các chủng gen *blaTEM* (45,3%), không phát hiện chủng nào mang nhóm gen *blaSHV*. Trong các kiểu gen của nhóm gen *blaCTX-M*, phổ biến nhất là kiểu gen *blaCTX-M-9* (66,3%), tiếp đến là kiểu gen *blaCTX-M-1* (26,3%) và thấp nhất là kiểu gen *blaCTX-M-9/CTX-M-1* (0,7%). Không phát hiện chủng nào mang kiểu gen *blaCTX-M-2* hoặc kiểu gen *blaCTX-M-8/25* (bảng 3.17). Sự phân bố các gen mã hóa sinh ESBL trong nghiên cứu này của chúng tôi tương tự như kết quả của một số nghiên cứu được thực hiện tại Việt Nam trong thời gian gần đây [95, 103]. Qua đó cho thấy được khuynh hướng phân bố các gen mã hóa sinh ESBL ở Việt Nam cũng tương tự trên thế giới, nhất là sự phân bố phổ biến và rộng khắp của *blaCTX-M* thay vì *blaTEM* và *blaSHV*, từ đó có thể khẳng định sự biến hóa linh hoạt và khó dự đoán cũng như khó kiểm soát của tình trạng kháng kháng sinh ở vi khuẩn.

Vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL có thể mang một hoặc nhiều gen mã hóa sinh ESBL. Trong nghiên cứu này chúng tôi phát hiện 41,6 % số chủng *E. coli* mang đồng thời 2 gen mã hóa sinh ESBL (biểu đồ 3.2) trong đó có 2 kiểu kết hợp là chủ yếu là *blaCTX-M-9/TEM* và *blaCTX-M-1/TEM* (bảng 3.18). Chúng tôi phát hiện 1 chủng mang đồng thời 3 gen *blaCTX-M-9/CTX-M-1/TEM* (bảng 3.19). Sự xuất hiện của nhiều gen mã hóa sinh ESBL trong cùng một chủng vi khuẩn sẽ làm thay đổi kiểu hình kháng kháng sinh theo hướng phức tạp hơn, làm cho vi khuẩn có thể kháng cùng lúc nhiều loại kháng sinh, gây tình trạng kháng đa thuốc rất nguy hiểm. Vì vậy cần có những biện pháp để quản lý và hạn chế sự lan truyền các vi khuẩn mang các gen kháng kháng sinh, đặc biệt là các trường hợp mang nhiều gen kháng kháng sinh để hạn chế sự lan truyền các nguồn tàng trữ gen kháng kháng sinh nguy hiểm cho cộng đồng.

Khi so sánh mức độ kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* mang kiểu gen *blaCTX-M-1* và *blaCTX-M-9* chúng tôi nhận thấy: Các chủng mang kiểu gen *blaCTX-M-1* có tỷ lệ kháng cao hơn so với các chủng mang kiểu gen *blaCTX-M-9* ở một số kháng sinh như CAZ (63,9% so với 16,5%), KAN (47,2% so với 12,1%), NAL (75% so với 48,4%), CHL (55,6% so với 26,4%) (bảng 3.20). Tỷ lệ kháng với các kháng sinh thử nghiệm còn lại ở 2 nhóm này tương đương nhau.

Đánh giá về mức độ kháng đa thuốc của các chủng *E. coli* sinh ESBL chúng tôi nhận thấy các chủng mang kiểu gen *blaCTX-M-1* và *blaCTX-M-9* có tỷ lệ kháng đa thuốc thấp nhất (69,2%), trong khi các kiểu gen còn lại đều có tỷ lệ kháng đa thuốc rất cao (trên 90%) (bảng 3.21). Mặt khác chúng tôi cũng nhận thấy mức độ kháng đa thuốc của các chủng nghiên cứu tăng dần theo số gen mã hóa sinh ESBL các chủng đó mang. Ở các chủng mang 1 gen mã hóa sinh ESBL tỷ lệ kháng đa thuốc là 78,9%, tỷ lệ này là 94,7% ở các chủng mang 2 gen mã hóa sinh ESBL và 100% ở các chủng mang 3 gen

mã hóa sinh ESBL (biểu đồ 3.3). Kết quả này cho thấy khả năng kháng thuốc của các chủng *E. coli* sinh ESBL có liên quan với các gen kháng thuốc mà chúng mang. Mỗi gen kháng thuốc sẽ quy định khả năng kháng của vi khuẩn với một hoặc nhiều kháng sinh khác nhau, vì vậy việc mang đồng thời gen nhiều gen kháng thuốc sẽ làm gia tăng khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn với nhiều kháng sinh khác nhau.

Bên cạnh đó tình trạng vi khuẩn *E. coli* kháng colistin - một kháng sinh được coi là lựa chọn cuối cùng cho các nhiễm khuẩn Gram âm kháng đa thuốc, đã được thông báo ở nhiều nơi trên thế giới. Năm 2015, gen *mcr-1* kháng colistin đã được phát hiện lần đầu tiên tại Trung Quốc [81], sau đó các gen này được phát hiện tại Mỹ [90], và một số nơi trên thế giới. Tính đến tháng 2 năm 2017, *mcr-1* đã được phát hiện tại hơn 30 quốc gia trên 5 châu lục [26].

Tại Việt Nam, các chủng vi khuẩn kháng colistin đã được phát hiện ở thực phẩm, gia súc, gia cầm [87, 97] và ở bệnh nhân trong bệnh viện [9].

Trong nghiên cứu này chúng tôi phát hiện 11 /137 (8,0%) chủng *E. coli* sinh ESBL mang gen *mcr-1* kháng colistin (biểu đồ 3.4). Việc sử dụng các thuốc có colistin trong phòng và điều trị bệnh trong chăn nuôi ở khu vực này khá thường xuyên (>50% hộ gia đình) [94] có lẽ là nguyên nhân xuất hiện các chủng mang gen kháng colistin. Mặt khác kết quả một nghiên cứu gần đây của chúng tôi thực hiện trên mẫu phân gà và phân lợn thu thập từ 42 hộ gia đình trong các hộ gia đình nói trên cho thấy tỷ lệ vi khuẩn kháng colistin chiếm tỷ lệ rất cao (>90%), trong đó chủ yếu là các vi khuẩn mang gen *mcr-1* (35/36 ở mẫu phân gà, và 33/36 ở mẫu phân lợn)[72]. Đây có thể là nguồn tàng trữ nguy hiểm các vi khuẩn kháng colistin trong cộng đồng. Các ổ tàng trữ này không chỉ làm lây nhiễm và lan truyền các vi khuẩn kháng colistin trên gia súc gia cầm mà chúng còn gây ô nhiễm môi trường và nhiễm cho người. Vì vậy cần có những biện pháp hạn chế việc sử dụng colistin trong

chăn nuôi ở khu vực này, góp phần hạn chế sự gia tăng các vi khuẩn kháng colistin trong cộng đồng.

4.2.4. Đặc điểm phân nhóm phát sinh loài của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Phân tích đặc điểm nhóm phát sinh loài của các chủng *E. coli* sinh ESBL phân lập từ mẫu phân người khỏe mạnh chúng tôi nhận thấy: có sự tồn tại cả 4 nhóm A, B1, B2 và D, trong đó các nhóm A chiếm tỷ lệ cao nhất (43,1%), tiếp đến là nhóm D (32,1%), nhóm B1 (14,6%) và thấp nhất là ở nhóm B2 (10,2%) (biểu đồ 3.6). Kết quả này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Bùi Thị Mai Hương và cộng sự nghiên cứu trên người khỏe mạnh trong cộng đồng tại Hà Nội [65]. Từ đó cho thấy phần lớn các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL ở người khỏe mạnh tại cộng đồng thuộc các nhóm A, D và B1. Điều này đồng nghĩa với các vi khuẩn này chủ yếu là vi khuẩn *E. coli* cộng sinh đường ruột thông thường hoặc có thể là các chủng *E. coli* cơ hội gây bệnh lý đường ruột nếu các chủng vi khuẩn này có mang gen độc lực. Tuy nhiên vẫn có một lượng nhỏ các chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL này thuộc nhóm B2 (10,2 %). Đây là nhóm đã được chứng minh có độc lực cao, có khả năng gây bệnh không chỉ ở đường tiêu hóa mà còn có khả năng gây nhiễm khuẩn tiết niệu, nhiễm khuẩn huyết [39] vì vậy việc lưu hành của nhóm này trong đường ruột người khỏe mạnh sẽ tiềm tàng nguy cơ gây bệnh cho những người khỏe mạnh trong cộng đồng.

Đánh giá khả năng kháng kháng sinh của các nhóm phát sinh loài, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ kháng các kháng sinh thuộc họ betalactamase, quinolone, fosfomycin và ức chế con đường folate ở cả 4 nhóm phát sinh loài là tương đương nhau. Tuy nhiên với các nhóm kháng sinh còn lại thì có sự khác biệt về tỷ lệ kháng giữa các nhóm: Nhóm B2 có tỷ lệ kháng cao với streptomycin, nhóm B1 có tỷ lệ kháng chloramphenicol cao nhất, trong khi nhóm D có tỷ lệ kháng với 1 số kháng sinh như Gentamycin, ciprofloxacin, chloramphenicol thấp nhất (bảng 3.22). Tuy nhiên đánh giá mức độ kháng đa thuốc của các nhóm phát

sinh loài chúng tôi nhận thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm (bảng 3.23).

4.2.5. Đặc điểm các gen độc lực của các chủng *E. coli* sinh ESBL

E. coli là vi khuẩn sống cộng sinh chiếm ưu thế trong hệ vi sinh vật đường ruột của người và động vật. Tuy nhiên, khi có điều kiện thích hợp, một số nhóm *E. coli* gây độc tăng sinh mạnh, trở thành nguyên nhân gây tiêu chảy nghiêm trọng trên người và gia súc.

Một số nghiên cứu gần đây cho thấy gen độc lực của *E. coli* không chỉ được phát hiện ở bệnh nhân tiêu chảy mà còn được phát hiện ở trong đường tiêu hóa của những người khỏe mạnh, thậm chí ở cả trẻ em mới sinh [34, 59, 125]. Các chủng *E. coli* gây tiêu chảy như EAEC, EPEC, ETEC, STEC xuất hiện ở các bệnh nhân tiêu chảy và các bệnh nhân không tiêu chảy với tỷ lệ tương đương nhau [34].

Nhằm tìm hiểu sự có mặt của các gen độc lực của các chủng *E. coli* gây tiêu chảy ở người khỏe mạnh, chúng tôi tiến hành xác định 11 gen độc lực đại diện cho 6 nhóm *E. coli* gây tiêu chảy. Kết quả cho thấy trong 137 chủng *E. coli* sinh ESBL nghiên cứu, chúng tôi phát hiện có 63 chủng (46%) mang gen độc lực (bảng 3.24), tỷ lệ này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Bueris (18,7%) [34], Hoàng Thị Bích Ngọc (33,3%) [15]. Đây là mối nguy cơ tiềm tàng đe dọa sức khỏe cho người bệnh tại cộng đồng bởi lẽ người khỏe mạnh mang các vi khuẩn chứa độc tố có thể đào thải ra ngoài môi trường, với điều kiện thời tiết nước ta rất dễ lan truyền và bùng phát thành các dịch tiêu chảy tại cộng đồng.

Trong các chủng mang gen độc lực được phát hiện, chúng tôi nhận thấy Các chủng EAEC và EPEC chiếm ưu thế với tỷ lệ lần lượt là 21,1 % (29/137 chủng, tất cả các chủng này đều mang gen *AstA*) và 15,6 % (21/137 chủng, trong đó 14 chủng mang gen *bfpA* được xếp vào nhóm EPEC điển hình và 7 chủng *E. coli* mang gen *eaeA* nhưng lại âm tính với các gen *bfpA* được xếp vào

nhóm aEPEC-EPEC không điển hình)(bảng 3.24). Sự phổ biến của các chủng EAEC và EPEC trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của các tác giả Bueris tại Braxin [34], Hedge tại Ấn Độ [62], NV Trung [116] và Hoàng Thị Bích Ngọc tại Hà Nội [15] khi các tác giả này nghiên cứu về *E. coli* gây tiêu chảy ở trẻ em có tiêu chảy và không tiêu chảy. Điều này cũng đồng nghĩa với việc các chủng EAEC và EPEC là các chủng *E. coli* phổ biến ở cả bệnh nhân tiêu chảy và người khỏe mạnh.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy các chủng ETEC và chiếm tỷ lệ thấp (5,1%) (bảng 3.24) trong đó 1 chủng mang gen *LT*, 2 chủng mang cả *LT* và *StIa*, 4 chủng mang *StIb*. Yếu tố STa của chủng EPEC đã được Pitari báo cáo rằng có khả năng ngăn chặn sự tăng sinh tế bào ung thư ruột non [104]. Vì vậy, mặc dù các chủng EPEC là tác nhân gây tiêu chảy nhưng việc mang các chủng này ở người khỏe mạnh có thể có tác dụng bảo vệ cơ thể chống lại căn bệnh ung thư ruột non.

Ngoài các chủng mang gen độc lực thuộc một nhóm *E. coli* gây tiêu chảy, trong nghiên cứu này chúng tôi cũng phát hiện 6 chủng mang các gen độc lực thuộc cả 2 nhóm EAEC/DEAC (5 chủng) và EAEC/EPEC (1 chủng) (bảng 3.24). Việc xuất hiện đồng thời các gen này gợi ý về khả năng gia tăng nguy cơ xuất hiện tiêu chảy ở những người khỏe mạnh tại cộng đồng.

Trong nghiên cứu này chúng tôi không phát hiện chủng vi khuẩn nào mang các gen *stx1*, *stx2* (đại diện cho nhóm EHEC) và *ipaH* (đại diện cho nhóm EIEC). Có 74 chủng trong nghiên cứu không phát hiện được các gen độc lực (bảng 3.24).

Gần đây một số tác giả tìm hiểu mối liên quan giữa sự xuất hiện các gen độc lực của *E. coli* với tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn này. Tuy nhiên mối liên quan giữa các gen kháng kháng sinh và gen độc lực ở các chủng *E. coli* chưa được sáng tỏ [53, 89, 99]. Nhằm tìm hiểu về mối liên quan

này, chúng tôi tiến hành phân tích đặc điểm kháng đa thuốc của các chủng *E. coli* mang gen độc lực. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi: Tất cả các chủng mang các gen độc lực thuộc nhóm EAEC/DEAC và EAEC/EPEC đều là các chủng kháng đa thuốc, các chủng EPEC và EAEC có tỷ lệ kháng đa thuốc cao với tỷ lệ lần lượt là 95,2% và 93,1%. Các chủng ETEC có tỷ lệ kháng đa thuốc thấp (50,0 %) (bảng 3.25), tuy nhiên chủng này chỉ chiếm một tỷ lệ rất nhỏ trong cộng đồng. Việc mang các vi khuẩn chứa đồng thời các gen độc lực và gen kháng đa thuốc sẽ tiềm tàng nguy cơ gây ra các bệnh lý tiêu chảy kháng đa thuốc cho người khỏe mạnh trong cộng đồng. Hơn nữa các vi khuẩn này cư trú trong đường ruột, khi được đào thải ra ngoài qua phân, với điều kiện thời tiết nóng ẩm nước ta rất dễ lan truyền và bùng phát các dịch tiêu chảy kháng đa thuốc tại cộng đồng.

Khi phân tích đặc điểm mang gen độc lực theo nhóm phát sinh loài chúng tôi nhận thấy: gen độc lực được phát hiện ở cả 4 nhóm phát sinh loài trong đó cao nhất ở nhóm B2 (57,1%), tiếp đến là nhóm B1(55,0%), nhóm D (45,5%) và thấp nhất là nhóm A (40,6%) (bảng 3.26). Kết quả này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Escobar-Páramo trên các chủng *E. coli* được phân lập từ người khỏe mạnh tại Pháp [48] và ZhaoR nghiên cứu trên bệnh nhân nhiễm khuẩn tiết niệu nằm viện lâu ngày tại Đài Loan[123]. Điều này khá phù hợp với đặc điểm của nhóm B2 đã được chứng minh là nhóm có khả năng gây bệnh cao nhất ở người.

4.2.6. Mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng *E. coli* sinh ESBL

Hiện nay kỹ thuật PFGE là kỹ thuật sinh học phân tử được nhiều nhà khoa học sử dụng để nghiên cứu và đánh giá sự lây truyền của các vi khuẩn gây bệnh ở trong bệnh viện và cộng đồng.

Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL có sự đa dạng về kiểu gen, tuy nhiên giữa các chủng trong cùng một nhóm kiểu gen

thường có mối liên hệ gần: Nghiên cứu của Mnif cho thấy các chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL phân lập từ bệnh viện tại Tunisia có mức độ tương đồng gen là 62,8%, trong đó 90/148 chủng có mức tương đồng trên 80%, có mối liên quan gần giữa các chủng được thu thập từ các thời gian và địa điểm khác nhau [91]. Nghiên cứu của tác giả Daoud tại Lebanon chứng minh mặc dù các chủng *E. coli* phân lập từ bệnh nhân nhiễm khuẩn tiết niệu có sự đa dạng về kiểu gen nhưng giữa các chủng trong cùng một nhóm có độ tương đồng rất cao (>95%) [47].

Tương tự như các nghiên cứu trên, nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy các chủng *E. coli* sinh ESBL ở người khỏe mạnh tại Thái Bình có sự đa dạng về kiểu gen, tuy nhiên giữa các chủng trong cùng một nhóm kiểu gen thường có mối liên hệ gần. Kết quả nghiên cứu ở hình 3.3 cho thấy 54,9% (73/133) các chủng *E. coli* sinh ESBL không có mối liên quan chặt chẽ về kiểu gen (có mức tương đồng dưới 80%). Điều đó chứng tỏ sự đa dạng về mặt kiểu gen của những chủng *E. coli* sinh ESBL. Tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL không có mối liên quan chặt chẽ về kiểu gen trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với tỷ lệ này trong nghiên cứu của tác giả Liao (75 %) trên các chủng *E. coli* phân lập từ bệnh viện tại Trung Quốc [80]. Sự khác biệt này có lẽ là do các chủng trong nghiên cứu của chúng tôi được phân lập từ các thành viên trong các hộ gia đình trong cùng một xã trong khi các chủng trong nghiên cứu của Liao được phân lập từ bệnh viện nên các chủng này có thể được phân lập từ các cá thể ở các khu vực địa lý khác nhau, do đó nguồn gốc di truyền của các chủng này có thể đa dạng hơn.

Các chủng *E. coli* sinh ESBL có liên quan đến một hoặc nhiều chủng khác với ngưỡng tương đồng về kiểu gen từ 80% trở lên chiếm 45,1% (60/133), trong đó 28 (21,1%) chủng có mối liên quan gần về kiểu gen với mức tương đồng từ 80% đến dưới 95% và 32 chủng (24%) có mối liên quan

rất chặt chẽ về kiểu gen với có mức tương đồng từ 95% đến 100%. Các chủng có ngưỡng tương đồng từ 95% trở lên được phân bố trong 15 nhóm kiểu gen, trong đó phần lớn là các nhóm có 2 chủng (14/15 nhóm), chỉ có 1 nhóm gồm 4 chủng. Phân tích 15 nhóm kiểu gen này chúng tôi nhận thấy: có 9 nhóm bao gồm các chủng được phân lập từ các thành viên trong cùng hộ gia đình, đó là các nhóm: nhóm 2 (gồm chủng 31 và 32, hộ gia đình số 10); nhóm 3 (gồm các chủng 147, 148, 149 và 150, hộ gia đình 64); nhóm 8 (gồm các chủng 59 và 59, hộ gia đình 20); nhóm 10 (gồm các chủng 92 và 199, hộ gia đình 38); nhóm 11 (gồm các chủng 56 và 57, hộ gia đình 20); nhóm 12 (gồm chủng 121 và 122, hộ gia đình 48); nhóm 13 (gồm các chủng 103 và 105, hộ gia đình 42); nhóm 14 (gồm các chủng 70 và 71, hộ gia đình 24) và nhóm 15 (gồm 2 chủng 22 và 23, hộ gia đình 8). Sáu nhóm còn lại trong 15 nhóm là nhóm 1, nhóm 4, nhóm 5, nhóm 6, nhóm 7, nhóm 9 chứa các chủng được phân lập từ các chủng thuộc các hộ gia đình khác nhau. Mặt khác, đánh giá kiểu hình kháng kháng sinh giữa các chủng trong cùng 1 nhóm trong 15 nhóm này chúng tôi nhận thấy các chủng thuộc nhóm 3, nhóm 4, nhóm 7, nhóm 12 có kiểu hình kháng kháng sinh hoàn toàn giống nhau (hình 3.3). Khi các chủng *E. coli* sinh ESBL giữa các cá thể trong cùng nhóm có mối liên quan rất chặt chẽ với nhau cho thấy các chủng này có cùng nguồn gốc di truyền và xuất phát từ cùng một nguồn lây nhiễm (thực phẩm, nước uống) hoặc có thể là sự lây nhiễm từ cá thể này sang cá thể khác. Sự lây nhiễm các chủng *E. coli* sinh ESBL này không chỉ xảy ra giữa các thành viên trong cùng một hộ gia đình (nhóm 2, 3, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15), mà còn đang xảy ra trong quần thể người khỏe mạnh tại Thái Bình (nhóm 1, 4, 5, 6, 7, 9). Do đó cần có các biện pháp can thiệp hiệu quả nhằm ngăn chặn sự lan truyền của các chủng vi khuẩn này trong cộng đồng.

Như vậy bằng kỹ thuật PFGE đã chứng minh được sự lây nhiễm của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL giữa các thành viên trong cùng hộ gia đình và trong cộng đồng người khỏe mạnh tại nông thôn Thái Bình. Tuy nhiên một số chủng *E. coli* sinh ESBL không xác định được mối liên hệ về kiểu gen. Phải chăng do các gen mã hóa sinh ESBL thường nằm trên plasmid, một số ít trường hợp gen mã hóa sinh ESBL nằm trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn nên phương thức lây truyền gen mã hóa sinh ESBL chủ yếu qua các plasmid sang các loại vi khuẩn đường ruột sống cộng sinh ở đường tiêu hóa của người và động vật.

4.2.7. Phân tích đặc điểm plasmid của các chủng *E. coli* sinh ESBL

Plasmid là một trong những yếu tố di truyền động có vai trò quan trọng trong sự lan truyền các gen kháng kháng sinh. Việc thu nhận các gen mới bằng các plasmid thông qua các yếu tố di truyền hoặc các trình tự chèn, và khả năng sao chép của chúng trong một loạt các vật chủ, khiến chúng trở thành các véc tơ hoàn hảo cho sự lây lan của vi khuẩn kháng thuốc [124]. Plasmid bao gồm nhiều loại khác nhau, sự phân loại các plasmid chủ yếu dựa trên sự tương thích trong thí nghiệm tiếp hợp. Hiện tại, ở *Enterobacteriaceae* có 28 loại plasmid được biết, các plasmid này được phát hiện bằng kỹ thuật PCR và được gọi là Inc. Trong các plasmid thì IncF, IncI, IncA/C, IncL, IncN và IncH là những loại mang nhiều loại gen kháng thuốc nhất [100, 106].

Hiện nay kỹ thuật phân loại plasmid bằng PCR được coi là phương pháp chuẩn để xác định các plasmid của *Enterobacteriaceae* [38]. Khi xác định các plasmid bằng kỹ thuật PCR đa môi và phân tích số lượng các plasmid trong 137 chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL phân lập từ người khỏe mạnh, kết quả cho thấy có 127 chủng (chiếm 92,7%) mang plasmid với tổng số 283 plasmid (trung bình 2,23 plasmid trên 1 chủng, phân bố từ 1- 6

plasmid trên 1 chủng). Trong các chủng mang plasmid được phát hiện thì phổ biến nhất là các chủng mang 2 plasmid (42,3%), tiếp đến là các chủng mang 3 plasmid (27,7%) và 1 plasmid (16,1%). Các chủng mang từ 4 plasmid trở lên chiếm tỷ lệ thấp. Không xác định được plasmid ở 10/137 (7,3%) chủng (biểu đồ 3.7). Sự phân bố số lượng các plasmid này cũng tương tự như kết quả trong nghiên cứu của Marcade (2008) [88]. Điều này cho thấy phần lớn các chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL mang đồng thời ít nhất hai plasmid khác nhau. Việc mang đồng thời các plasmid cũng đồng nghĩa với việc các vi khuẩn này mang nhiều gen kháng kháng sinh khác nhau trong đó có gen mã hóa ESBL. Hơn nữa, do đặc tính của plasmid là có thể truyền theo chiều dọc giữa các thể hệ vi khuẩn trong cùng loài hoặc truyền ngang từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác trong cùng loài hoặc khác loài, nên sự lưu hành các vi khuẩn này ở người khỏe mạnh trong cộng đồng sẽ là nguồn tàng trữ và lan truyền các vi khuẩn kháng đa thuốc trong cộng đồng.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát hiện 17 trong 18 loại plasmid thường gặp ở *E. coli*. Trong đó các plasmid thuộc nhóm IncF là phổ biến nhất (FIB: 56,93%; Frep: 51,82%; FIA: 24,82%, FIC: 2,92%); tiếp đến là các plasmid nhóm IncI (B/O: 21,9% ; K/B: 2,92%, I1: 9,49%); các plasmid P, T, Y, K/B, X, HI1, N, HI2, L/M xuất hiện với tỷ lệ thấp; không phát hiện chủng nào mang plasmid W (bảng 3.27). Sự phân bố các loại plasmid của các chủng *E. coli* sinh ESBL này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Marcade [88] và Johnson [69]. Điều này cho thấy các plasmid thuộc nhóm IncF có phân bố rộng rãi trong các chủng *E. coli* sinh ESBL và dường như phù hợp với đặc điểm của các IncF là plasmid phổ biến nhất chứa các gen mã hóa ESBL. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh sự lây lan toàn cầu của các chủng *E. coli* mang *blaCTX-M* ở người có liên quan với các plasmid IncFII [46, 106]. Tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy ở các vi khuẩn

mang plasmid nhóm IncF không chỉ phổ biến ở các vi khuẩn mang *blaCTX-M* mà còn xuất hiện ở hầu hết các chủng mang *blaTEM*. Do đó các plasmid này có thể làm tăng nguy cơ lan truyền cả *blaCTX-M* và *blaTEM* ở các chủng *E. coli* trên địa bàn nghiên cứu.

Các chủng mang kiểu gen *blaCTX-M* có thể mang nhiều plasmid khác nhau nhưng phổ biến nhất là các FIB (56,9%), tiếp đến là các plasmid như Frep (54,2%), B/O (30,6%), FIA (29,2%). Ngoài ra còn có các plasmid khác như FIC, A/C, P, FIIA, Y, K/B, I1, X, HI1, HI2, N và L/M được phát hiện với tỷ lệ thấp. Các chủng mang kiểu gen *blaTEM* thì FIB và Frep là 2 plasmid phổ biến. Ngoài ra còn có sự xuất hiện của các plasmid B/O, FIC và HI2. Các chủng mang kiểu gen *blaCTX-M/TEM*, thì FIB được phát hiện ở 33/57 chủng (57,9%), Frep được phát hiện ở 28/57 chủng (49,1%). Các plasmid như FIA, Y, I1 và B/O cũng khá phổ biến (>10%). Ngoài ra các plasmid khác như FIC, P, T, K/B X, HI1, N, HI2 và L/M chiếm tỷ lệ thấp (bảng 3.28).

Phân tích số lượng plasmid ở các chủng mang các kiểu gen mã hóa sinh ESBL khác nhau chúng tôi nhận thấy: các chủng có kiểu gen *blaCTX-M* có tỷ lệ mang plasmid là 88,9 %, trong đó các chủng mang 3 plasmid chiếm tỷ lệ cao nhất (38,9%), tiếp đến là các chủng mang 2 plasmid (29,2%). Các chủng mang 1 và 4 plasmid chiếm tỷ lệ thấp với tỷ lệ lần lượt là 15,3% và 5,6%. Tất cả các chủng có kiểu gen *blaTEM* đều chứa 2 hoặc 3 plasmid, trong đó chủ yếu là 2 plasmid. Các chủng mang kiểu gen *blaCTX-M/TEM* có tỷ lệ mang plasmid là 96,5%, với 1 đến 6 plasmid trên cùng 1 chủng, trong đó phổ biến nhất là các chủng mang 2 plasmid (56,1%), tiếp đến là các chủng mang 1 và 3 plasmid với tỷ lệ lần lượt là 19,3% và 14,0%. Các chủng mang từ 4 plasmid trở lên chiếm tỷ lệ thấp (bảng 3.29).

Các nghiên cứu dịch tễ học phân tử các vi khuẩn sinh ESBL cho thấy

hầu hết các gen mã hóa sinh ESBL ở các vi khuẩn họ *Enterobacteriaceae* nằm trên các plasmid có kích thước lớn (50kb đến >500kb), tuy nhiên có một số chủng mang gen mã hóa sinh ESBL nằm trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn [106]. Nghiên cứu của tác giả Higa và cộng sự tại Nhật Bản cho thấy: 90% các gen mã hóa sinh CTX-M nằm trên plasmid, 10% nằm trên nhiễm sắc thể và chỉ có 2% nằm trên cả nhiễm sắc thể và plasmid. Tất cả các *blaCTX-M* nằm trên nhiễm sắc thể là *blaCTX-M-9* [64]

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng kỹ thuật Southern Blot nhằm xác định vị trí của các gen mã hóa sinh ESBL trên plasmid. Trong 37 chủng *E. coli* sinh ESBL được thực hiện kỹ thuật Southern Blot có 4 chủng mang gen *blaCTX-M-1*, 7 chủng mang *blaCTX-M-1/TEM*, 21 chủng mang *blaCTX-M-9*, 4 chủng mang *blaCTX-M-9/TEM* và 1 chủng mang *blaTEM*. Kết quả lai cho thấy, 25/37 chủng (chiếm 67,6%) mang gen mã hóa sinh ESBL nằm trên plasmid có kích thước từ 56,7 kb đến 157 kb. Kết quả này cho thấy phần lớn các gen mã hóa sinh ESBL nằm trên plasmid. Đây là điều kiện thuận lợi cho sự lan truyền các vi khuẩn mang các gen mã hóa sinh ESBL trong cộng đồng bởi lẽ nhiều nghiên cứu đã chứng minh plasmid là con đường chủ yếu lan truyền các gen kháng kháng sinh. Thông qua plasmid, các gen này có thể được truyền dọc từ thế hệ vi khuẩn này sang thế hệ vi khuẩn khác trong cùng loài. Nguy hiểm hơn các gen kháng thuốc này có thể được truyền ngang từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác trong cùng loài hoặc khác loài, thậm chí là từ vi khuẩn không gây bệnh sang vi khuẩn gây bệnh, làm gia tăng tình trạng kháng thuốc trong cộng đồng.

Các plasmid này có thể chứa một gen *blaCTX-M*, một gen *blaTEM* hoặc chứa đồng thời cả 2 gen *blaCTX-M* và *blaTEM* (bảng 3.30). Tỷ lệ phát hiện các plasmid mang gen *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-9* và *blaTEM* lần lượt là 36,4%, 76% và 75%. Điều này gợi ý khả năng lan truyền qua plasmid của các

gen *blaCTX-M-9* và *blaTEM* có thể cao hơn so với các gen *blaCTX-M-1*.

Trong 11 chủng mang đồng thời 2 gen mã hóa sinh ESBL *blaCTX-M* và *blaTEM*, chúng tôi phát hiện có 2 chủng mang cả hai gen này trên cùng một plasmid, 4 chủng mang 2 gen này trên hai plasmid khác nhau; 2 chủng chỉ phát hiện được plasmid mang gen *blaTEM*, và 2 chủng không phát hiện được plasmid mang gen nào. Việc mang cùng lúc các plasmid chứa đồng thời 2 gen trên cùng 1 chủng vi khuẩn, đặc biệt là việc mang đồng thời 2 gen trên cùng 1 plasmid sẽ tạo điều kiện thuận lợi làm gia tăng khả năng lan truyền các gen mã hóa sinh ESBL trong cộng đồng thông qua sự lan truyền các plasmid.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy ở các chủng vi khuẩn khác nhau thì các gen mã hóa sinh ESBL nằm trên các plasmid có kích thước khác nhau. Điều đó cho chúng ta thấy sự đa dạng của các plasmid mang gen mã hóa sinh ESBL ở vi khuẩn *E. coli*. Điều này, thực sự có ý nghĩa trong lâm sàng vì các vi khuẩn gây bệnh như *E. coli* có thể tiếp nhận các gen mã hóa sinh ESBL qua trung gian plasmid, trở nên kháng với nhiều kháng sinh của họ này, gây khó khăn trong điều trị. Áp lực chọn lọc từ việc sử dụng các kháng sinh cephalosporin phổ mở rộng hiện nay sẽ làm duy trì quần thể vi khuẩn kháng thuốc này. Nhiều nghiên cứu gần đây đã chứng minh những nhân tố di truyền di động (mobile genetic elements) như plasmid, transposon và integron có thể lan truyền các gen kháng kháng sinh theo chiều dọc hoặc chiều ngang giữa các vi khuẩn [100]. Đồng thời, các nhân tố này còn đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển và lan truyền sự đa kháng của vi khuẩn [118]. Mặt khác một số kết quả nghiên cứu đã cho thấy sự tiếp hợp giữa các vi khuẩn đã làm lan truyền gen kháng kháng sinh [113].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã chứng minh 39,0 % các chủng vi khuẩn có khả năng truyền các plasmid mang các gen mã hóa sinh ESBL sang vi khuẩn *E. coli* J53. Tỷ lệ truyền plasmid này của chúng tôi cao hơn so với

kết quả nghiên cứu của Trần Huy Hoàng [10] khi truyền plasmid của các vi khuẩn khác cho *E. coli* J53. Có lẽ là do vi khuẩn cho của chúng tôi là *E. coli* nên giữa các vi khuẩn *E. coli* có thể dễ dàng xảy ra hiện tượng truyền plasmid hơn. Kết quả này cho thấy các vi khuẩn trong cùng loài *E. coli* có thể dễ dàng truyền gen kháng kháng sinh cho nhau. Đây là một vấn đề rất đáng lo ngại vì các các plasmid mang gen mã hóa ESBL có khả năng truyền từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác sẽ tạo điều kiện cho sự lây lan nhanh chóng các gen kháng kháng sinh trong quần thể vi khuẩn *E. coli* nói riêng và từ vi khuẩn *E. coli* sang các vi khuẩn gây bệnh khác.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy khả năng truyền plasmid mang gen *blaCTX-M-9* chiếm tỷ lệ cao nhất (45,2%), tiếp đến là plasmid mang gen *blaTEM* (25,0%) và thấp nhất là plasmid mang gen *blaCTX-M-1* (20,0 %). Tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ (bảng 3.31). Ở các chủng mang 2 gen mã hóa sinh ESBL thì tỷ lệ truyền đồng thời cả 2 gen (25%) cao hơn so với chỉ truyền 1 gen (10%) (bảng 3.32). Mặc dù số lượng các chủng mang 2 gen trong thử nghiệm của chúng tôi còn ít nên chưa thể đánh giá chính xác được tỷ lệ truyền gen của các chủng vi khuẩn mang từ 2 gen kháng kháng sinh trở lên, nhưng nó cũng cho thấy được xu hướng các vi khuẩn mang nhiều gen mã hóa sinh ESBL có thể truyền đồng thời nhiều gen cùng lúc cho các chủng vi khuẩn khác. Kết quả này của chúng tôi cũng tương tự như nghiên cứu của Vaidya [118] về khả năng truyền cùng lúc nhiều gen kháng kháng sinh của các vi khuẩn sinh ESBL thông qua hình thức tiếp hợp. Đây là một trong những nguyên nhân quan trọng làm cho tình trạng vi khuẩn kháng kháng sinh ngày càng lan rộng trong cộng đồng, đặc biệt là sự lan rộng của các chủng vi khuẩn kháng đa thuốc do truyền đồng thời cùng lúc nhiều gen kháng thuốc.

Việc chứng minh được các chủng *E. coli* sinh ESBL thu thập tại cộng đồng tại Thái Bình có khả năng truyền plasmid chứa gen mã hóa sinh ESBL sang *E. coli* J53 trong mô hình phòng thí nghiệm cho thấy khả năng và mức độ nguy hiểm về sự lây lan của các gen mã hóa sinh ESBL tại Việt Nam không chỉ xảy ra tại bệnh viện mà còn có thể dễ dàng xảy ra tại cộng đồng. Đây là một thực trạng gây nhiều khó khăn trong công tác kiểm soát, phòng chống sự lan truyền các chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL nói riêng và các vi khuẩn kháng kháng sinh nói chung. Kết quả nghiên cứu này giúp chúng ta hiểu sâu hơn về đặc tính lan truyền của vi khuẩn mang gen mã hóa sinh ESBL tại Việt Nam.

4.3. Hạn chế và hướng nghiên cứu tiếp theo

Nghiên cứu đã đánh giá được thực trạng mang, mức độ kháng thuốc, và một số đặc điểm của các chủng *E. coli* sinh ESBL tại cộng đồng nông thôn tỉnh Thái Bình. Nhiều kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại đã được áp dụng trong nghiên cứu để từng bước chứng minh được sự lây truyền của một số chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL và lan truyền của các gen mã hóa ESBL thông qua các plasmid. Đây là các phát hiện quan trọng góp phần từng bước hiểu được cơ chế kháng kháng sinh, nguồn truyền nhiễm và khả năng lây truyền của vi khuẩn mang gen mã hóa ESBL, là cơ sở đưa ra các biện pháp phòng chống, điều trị có hiệu quả và hạn chế sự lây lan của vi khuẩn này trong bệnh viện và cộng đồng. Tuy nhiên do giới hạn về thời gian, kinh phí thực hiện và trong khuôn khổ của một luận án nghiên cứu sinh không thể giải quyết được toàn bộ các vấn đề liên quan tới khía cạnh dịch tễ, vi sinh và sinh học phân tử. Vì vậy cần thiết có các nghiên cứu tiếp theo để làm sáng tỏ nguồn truyền nhiễm, các yếu tố nguy cơ và chứng minh nguy cơ lây lan của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL trong cộng đồng. Ngoài ra cũng cần thiết có các nghiên cứu can thiệp nhằm đưa ra các giải pháp nhằm hạn chế sự lây nhiễm và lan truyền các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL nói riêng và các vi khuẩn kháng kháng sinh trong cộng đồng.

KẾT LUẬN

1. Sự lưu hành của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh tại cộng đồng huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình, năm 2016.

Tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL trong mẫu phân người khỏe mạnh tại cộng đồng xã Nguyên Xá, huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình chiếm tỷ lệ cao: 64,6% (137/212). Tỷ lệ sinh ESBL của các chủng *E. coli* kháng CTX được phân lập từ những người khỏe mạnh chiếm tỷ lệ rất cao 137/169 (81,1%).

Không có sự khác biệt về tỷ lệ mang *E. coli* sinh ESBL giữa những người có giới tính, nhóm tuổi, trình độ học vấn và nghề nghiệp khác nhau.

2. Đặc điểm sinh học của các chủng *E. coli* sinh ESBL phân lập được tại địa bàn nghiên cứu

- **Đặc điểm kháng kháng sinh:** Các vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL kháng hoàn toàn với ampicillin, kháng khá cao (21,2% đến 81%) với các kháng sinh thông dụng. *E. coli* sinh ESBL kháng đa thuốc chiếm tỷ lệ cao (86,1%).

- **Đặc điểm gen mã hóa sinh ESBL:** 91,4 % các chủng mang gen mã hóa sinh CTX-M, trong đó phổ biến nhất là *blaCTX-M-9* (66,3%). Tỷ lệ mang gen mã hóa sinh TEM là 45,3%, không phát hiện chủng nào mang gen mã hóa sinh SHV. Trên 1 chủng *E. coli* sinh ESBL có thể mang từ 1-3 gen mã hóa ESBL, trong đó phổ biến nhất là mang 1 gen (55,5%) và 2 gen (41,6%) với kiểu kết hợp *blaCTX-M/TEM* chiếm đa số.

- **Đặc điểm gen kháng colistin:** Tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL mang gen *mcr-1* kháng colistin là 8%

- **Đặc điểm nhóm phát sinh loài:** 89,8 % các chủng *E. coli* sinh ESBL ở người khỏe mạnh tại cộng đồng là vi khuẩn *E. coli* cộng sinh đường ruột thông thường thuộc các nhóm A (43,1%), D (32,1%) và B1(14,6%); 10,2 % thuộc nhóm B2, là nhóm có độc lực cao, có khả năng gây bệnh.

- **Đặc điểm các gen độc lực:** 46% các chủng *E. coli* sinh ESBL mang gen độc lực. Trong đó phổ biến nhất là các chủng *E. coli* thuộc nhóm EAEC (21,1%) và EPEC (15,6%).

- **Mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng *E. coli* sinh ESBL:** Các chủng *E. coli* sinh ESBL khá đa dạng về kiểu gen. Tuy nhiên kết quả PFGE cho thấy có sự lây nhiễm của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL giữa các giữa các thành viên trong cùng hộ gia đình (với 9 nhóm kiểu gen bao gồm 20 chủng có sự tương đồng gen 95-110% giữa các thành viên trong cùng nhóm) và trong cộng đồng người khỏe mạnh tại nông thôn Thái Bình (với 6 nhóm kiểu gen bao gồm 12 chủng có sự tương đồng gen 95-110% giữa các thành viên trong cùng nhóm).

- **Đặc điểm plasmid của các chủng *E. coli* sinh ESBL:**

+ 92,7% các chủng *E. coli* sinh ESBL mang các plasmid chứa gen mã hóa sinh ESBL với số plasmid trung bình là 2,23 plasmid /chủng. Các plasmid thuộc nhóm IncF là phổ biến nhất (FIB: 56,93%; Frep:51,82%; FIA: 24,82%, FIC: 2,92%); tiếp đến là các plasmid nhóm I (B/O: 21,9%; K/B: 2,92%, I1: 9,49%), ngoài ra còn có các plasmid P, T, Y, K/B, X, HI1, N, HI2, L/M với tỷ lệ thấp.

+ Các plasmid có thể chứa một gen *bla*CTX-M, một gen *bla* TEM hoặc chứa đồng thời cả 2 gen *bla*CTX-M và *bla*TEM. Tỷ lệ phát hiện các plasmid mang gen *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-9 và *bla*TEM bằng Southern Blot lần lượt là 36,4%, 76% và 75%.

+Từ mô hình phòng thí nghiệm đã xác định các chủng *E. coli* sinh ESBL được thu thập tại cộng đồng ở Thái Bình có khả năng truyền plasmid chứa gen mã hóa ESBL sang *E. coli* J53.

KIẾN NGHỊ

1. Tỷ lệ người khỏe mạnh mang vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL trong nghiên cứu của chúng tôi là khá cao. Do đó cần có các biện pháp can thiệp hiệu quả để làm giảm tỷ lệ mang vi khuẩn này trong cộng đồng.
2. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy có sự lây nhiễm các chủng *E. coli* sinh ESBL trong cộng đồng tại Thái Bình. Cần tiếp tục triển khai các nghiên cứu sâu hơn để tìm ra con đường lan truyền của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL ở người, qua đó xây dựng các biện pháp giám sát và can thiệp nhằm hạn chế sự lây nhiễm và lan truyền các vi khuẩn này tại cộng đồng.

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

1. Khổng Thị Điệp, Phạm Ngọc Khái, Đỗ Thị Bích Ngọc, Hoàng Thị Thu Hà, (2019), “Đặc điểm nhóm phát sinh loài của các chủng *Escherichia coli* sinh ESBL phân lập từ mẫu phân người khỏe mạnh ở cộng đồng thuộc huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình, năm 2016”, *Tạp chí Y học Dự phòng*, tập 29 (3):42-47.
2. Khổng Thị Điệp, Phạm Ngọc Khái, Trần Huy Hoàng, Phạm Duy Thái, Hoàng Thị Thu Hà, (2019), “Đánh giá khả năng truyền plasmid mang các gen mã hóa ESBL từ các chủng *Escherichia coli* sinh ESBL phân lập từ mẫu phân người khỏe mạnh sang *Escherichia coli* J53 bằng hình thức tiếp hợp in vitro”, *Tạp chí Y học Dự phòng*, Tập 29 (12): 77-83.
3. Khổng Thị Điệp, Phạm Ngọc Khái, 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*, Tập 29 (12): 111-117.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Bộ Y tế(2013),*Vi sinh vật y học*, NXB y học, Hà Nội.
2. Bộ Y tế - GARP Việt Nam - OUCRU(2009),*Báo cáo sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh tại 15 bệnh viện Việt Nam năm 2008-2009*,
3. Bộ Y tế (2011),"Thông tư số 43/2011/TT-BYT: Quy định chế độ quản lý mẫu bệnh phẩm truyền nhiễm",
4. Cục Quản lý khám chữa bệnh Bộ Y tế (2015),"Tài liệu hướng dẫn sử dụng kháng sinh - Ban hành kèm theo Quyết định 708/QĐ-BYT ngày 2/3/2015 của Bộ Y tế", Hà Nội,
5. Khổng Thị Điệp, Trần Thị Hòa, Nguyễn Nam Thắng & et al (2015),"Tình trạng nhiễm vi khuẩn *Escherichia coli* sinh Beta -Lactamase phổ rộng trong mẫu phân người khỏe mạnh tại Nguyên Xá, Vũ Thư, Thái Bình năm 2013", *Tạp chí Y học Dự phòng*,Tập XXV, số 4 (164)
6. Hoàng Thị Phương Dung, Nguyễn Thanh Bảo & Võ Thị Chi Mai(2010),"Khảo sát trực khuẩn Gram âm sinh men β -lactamase phổ rộng phân lập tại bệnh viện Đại học Y Dược TPHCM", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*,14 (2)202-205.
7. GARP Việt Nam (2010),*Phân tích thực trạng sử dụng kháng sinh và kháng kháng sinh ở Việt Nam*,
8. Lê Kim Ngọc Giao, Tống Phi Khanh, Huỳnh Công Lý, Ngô T Quỳnh Hoa & Võ Thị Chi Mai(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 TP Hồ Chí Minh* 14 (4)40-43.
9. Trần Thị Hòa, Phan Ngọc Quang, Khổng Thị Điệp & Nguyễn Nam Thắng (2018),"Khảo sát tình trạng nhiễm *Enterobacteriaceae* kháng colistin ở bệnh nhân nội trú tại bệnh viện đa khoa Thái Bình và bệnh viện Nhi Thái Bình", *Tạp chí y học Việt Nam*,472 452-458.
10. Trần Huy Hoàng (2014),*Một số đặc điểm dịch tễ học của nhiễm khuẩn bệnh*

viện do vi khuẩn kháng carbapenem mang gen NDM-1 tại bệnh viện Việt Đức-Hà Nội, 2010-2011, Luận án tiến sĩ y học, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

11. Phan Thị Thu Hồng (2012), "Khảo sát vi khuẩn tiết men betalactamase phổ rộng tại bệnh viện bình dân", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, 16 (1) 285-301.
12. Đỗ Thị Thu Hương (2007), "Ứng dụng kỹ thuật PCR trong định danh các *E. coli* gây tiêu chảy ở trẻ em dưới 5 tuổi", *Tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh*, 11 (1) 31-33.
13. Võ Thị Chi Mai , Ngô Thị Quỳnh Hoa, Huỳnh Công Lý , et al. (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) 685-689.
14. Cao Minh Nga, Nguyễn Thị Yên Chi, Vũ Bảo Châu & Nguyễn Thanh Bảo (2013), "Sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *Klebsiella spp.* và *E. coli* sinh ESBL phân lập tại bệnh viện 175", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, 17 (1) 279-285.
15. Hoàng Thị Bích Ngọc (2016), *Xác định vai trò các nhóm Escherichia coli gây tiêu chảy ở trẻ em dưới 5 tuổi tại hà nội bằng phương pháp sinh học phân tử*, Luận án tiến sĩ y học, Viện vệ sinh Dịch tễ Trung ương.
16. Nguyễn Đỗ Phúc & Nguyễn Lý Hoàng Ngân (2014), "Tần suất phổ biến của vi khuẩn *Enterobacteria* sinh men β -lactamase trong cộng đồng tại Thành phố Hồ Chí Minh năm 2013", *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, 18 (6) 397-401.
17. Lê Văn Phụng (2012), *Vi khuẩn Y học*, NXB Giáo dục, Hà Nội
18. Nguyễn Thái Sơn (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*, 9 1-9.
19. Hà Vũ Minh Trang & Trần Đỗ Hùng (2013), "Khảo sát sự kháng kháng sinh và sinh men β -lactamase của *E. coli* gây tiêu chảy ở trẻ em", *Tạp chí Y học Thực hành*, 87 43-48.
20. Nguyễn Hoàng Thu Trang (2011), *Đặc điểm gen mã hóa β -lactamase phổ rộng ở một số vi khuẩn gram âm và nguy cơ lan truyền qua plasmid*, Luận văn thạc sĩ di truyền học Trường Đại học Khoa học tự nhiên TP Hồ Chí Minh.

21. 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)135-138.
22. Trường Đại học Y Hà Nội(2012),*Dược lý học Lâm sàng*, NXB Y học, Hà Nội
23. Mai Văn Tuấn & Nguyễn Thanh Bảo(2008),"Khảo sát trực khuẩn Gram âm sinh men lactamase phổ rộng phân lập tại bệnh viện Trung ương Huế", *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*,12 (1)1-7.

TÀI LIỆU TIẾNG ANH

24. Allocati N., Masulli M., Alexeyev M. F.&Di Ilio C. (2013),"Escherichia coli in Europe: an overview", *Int J Environ Res Public Health*,10 (12)6235-54.
25. Ambler R. P., Coulson A. F., Frere J. M., et al. (1991),"A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases", *Biochem J*,276 (Pt 1) 269-70.
26. Apostolakis I. &Piccirillo A. (2018),"A review on the current situation and challenges of colistin resistance in poultry production", *Avian Pathol*,47 (6)546-558.
27. Bean D. C., Livermore D. M., Papa I.&Hall L. M. (2005),"Resistance among *Escherichia coli* to sulphonamides and other antimicrobials now little used in man", *J Antimicrob Chemother*,56 (5)962-4.
28. Bell J. M., Turnidge J. D., Gales A. C., Pfaller M. A.&Jones R. N. (2002),"Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99)", *Diagn Microbiol Infect Dis*,42 (3)193-8.
29. Ben Sallem R., Ben Slama K., Estepa V., et al. (2012),"Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*,31 (7)1511-6.
30. Bialvaei A. Z. &Samadi Kafil H. (2015),"Colistin, mechanisms and prevalence of resistance", *Curr Med Res Opin*,31 (4)707-21.

31. Bontron Séverine, Poirel Laurent & Nordmann Patrice (2016), "Real-time PCR for detection of plasmid-mediated polymyxin resistance (mcr-1) from cultured bacteria and stools", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71 (8) 2318-2320.
32. Bradford P. A. (2001), "Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat", *Clin Microbiol Rev*, 14 (4) 933-51, table of contents.
33. Brown T. (2001), "Southern blotting", *Curr Protoc Immunol*, Chapter 10 Unit 10.6A.
34. Bueris V., Sircili M. P., Taddei C. R., et al. (2007), "Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102 (7) 839-44.
35. Bush K., Jacoby G. A. & Medeiros A. A. (1995), "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure", *Antimicrob Agents Chemother*, 39 (6) 1211-33.
36. Cao V., Lambert T., Nhu D.Q, et al. (2002), "Distribution of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam", *Antimicrob Agents Chemother*, 46 (12) 3739-43.
37. Carattoli A. (2009), "Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae", *Antimicrob Agents Chemother*, 53 (6) 2227-38.
38. Carattoli Alessandra, Bertini Alessia, Villa Laura, et al. (2005), "Identification of plasmids by PCR-based replicon typing", *Journal of Microbiological Methods*, 63 (3) 219-228.
39. Carlos C., Pires M. M., Stoppe N. C., et al. (2010), "Escherichia coli phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination", *BMC Microbiol*, 10 161.
40. Chakraborty A., Adhikari P., Shenoy S. & Saralaya V. (2015), "Clinical significance and phylogenetic background of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates from extra-intestinal infections", *J Infect Public Health*, 8 (3) 248-53.

41. Chang Y. T., Coombs G., Ling T., et al. (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", *Int J Antimicrob Agents*,49 (6)734-739.
42. CLSI (2012),"Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition, M02-A11 ",
43. CLSI (2015),"Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty –Fifth Information Supplement, M100-S25.",
44. Coque T. M., Novais A., Carattoli A., et al. (2008),"Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15", *Emerg Infect Dis*,14 (2)195-200.
45. Cormican M. G., Marshall S. A. & Jones R. N. (1996),"Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen", *J Clin Microbiol*,34 (8)1880-4.
46. Couturier M., Bex F., Bergquist P. L. & Maas W. K. (1988),"Identification and classification of bacterial plasmids", *Microbiological reviews*,52 (3)375-395.
47. Daoud Ziad, Salem Sokhn Elie, Masri Khalil, Matar Ghassan M. & Doron Shira (2015),"Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infections of Lebanese Patients between 2005 and 2012: Epidemiology and Profiles of Resistance", *Frontiers in medicine*,2 26-26.
48. Escobar-Paramo P., Le Menac'h A., Le Gall T., et al. (2006),"Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates", *Environ Microbiol*,8 (11)1975-84.
49. Garrec Hélène, Drieux-Rouzet Laurence, Golmard Jean-Louis, Jarlier Vincent & Robert Jérôme (2011),"Comparison of Nine Phenotypic Methods for Detection of Extended-Spectrum β -Lactamase Production by Enterobacteriaceae", *Journal of Clinical Microbiology*,49 (3)1048-1057.
50. Gebbie L. (2014),"Genomic Southern blot analysis", *Methods Mol Biol*,1099 159-77.

51. Geser N., Stephan R., Korczak B. M., Beutin L.&Hachler H. (2012),"Molecular identification of extended-spectrum-beta-lactamase genes from Enterobacteriaceae isolated from healthy human carriers in Switzerland", *Antimicrob Agents Chemother*,56 (3)1609-12.
52. Ghafourian S., Sadeghifard N., Soheili S.&Sekawi Z. (2015),"Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology", *Curr Issues Mol Biol*,17 11-21.
53. González Enrique A. &Blanco Jorge (1989),"Serotypes and antibiotic resistance of Verotoxigenic (VTEC) and Necrotizing (NTEC) Escherichia coli strains isolated from calves with diarrhoea", *FEMS Microbiology Letters*,60 (1)31-36.
54. Grohmann E., Muth G. &Espinosa M. (2003),"Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria", *Microbiol Mol Biol Rev*,67 (2)277-301, table of contents.
55. Guiral Elisabet, Pons Maria Jesús, Vubil Delfino, et al. (2018),"Epidemiology and molecular characterization of multidrug-resistant Escherichia coli isolates harboring bla(CTX-M) group 1 extended-spectrum β -lactamases causing bacteremia and urinary tract infection in Manhica, Mozambique", *Infection and drug resistance*,11 927-936.
56. Gupta K., Hooton T. M., Naber K. G., et al. (2011),"International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases", *Clin Infect Dis*,52 (5)e103-20.
57. Ha L.V. , Kawahara R., Diep K.T., et al. (2015),"Widespread dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing, multidrug-resistant Escherichia coli in livestock and fishery products in Vietnam", *International Journal of Food Contamination*,2 (1)17.
58. Hasman H., Hammerum A. M., Hansen F., et al. (2015),"Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant Escherichia coli isolates from

human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015", *Eurosurveillance (Online Edition)*,20 (49)1-5.

59. Hawamdeh Maysa F., Badranb Eman F., Dajani Naheel F.&Shehabia Asem A. (2016),"Occurrence of potential virulence factors and antimicrobial resistance markers in fecal *E. coli* isolates from infants", *The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents*,6 (3)
60. Hawkey P. M. & Jones A. M. (2009),"The changing epidemiology of resistance", *J Antimicrob Chemother*,64 Suppl 1 i3-10.
61. Hawser S. P., Bouchillon S. K., Hoban D. J., et al. (2009),"Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program, 2007", *Antimicrob Agents Chemother*,53 (8)3280-4.
62. Hegde A., Ballal M. & Shenoy S. (2012),"Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR", *Indian J Med Microbiol*,30 (3)279-84.
63. Herzer P. J., Inouye S., Inouye M. & Whittam T. S. (1990),"Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*", *J Bacteriol*,172 (11)6175-81.
64. Higa S., Sarassari R., Hamamoto K., et al. (2019),"Characterization of CTX-M type ESBL-producing Enterobacteriaceae isolated from asymptomatic healthy individuals who live in a community of the Okinawa prefecture, Japan", *J Infect Chemother*,25 (4)314-317.
65. Huong B. T.M, Hirai I., Ueda S., et al. (2015),"Carriage of *Escherichia coli* Producing CTX-M-Type Extended-Spectrum beta-Lactamase in Healthy Vietnamese Individuals", *Antimicrob Agents Chemother*,59 (10)6611-4.
66. J Soilleux M., M Morand A., Arlet Guillaume, R Scavizzi M. & Labia Roger (1996),"Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases: Prevalence of TEM-3 and first identification of TEM-26 in France", *Antimicrobial agents and chemotherapy*,40 1027-9.

67. Johnson J. K., Arduino S. M., Stine O. C., Johnson J. A. & Harris A. D. (2007), "Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*", *J Clin Microbiol*, 45 (11) 3707-12.
68. Johnson J. R., Kuskowski M. A., O'Bryan T. T., Colodner R. & Raz R. (2005), "Virulence genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among *Escherichia coli* urine sample isolates from Israeli women with acute uncomplicated cystitis", *Antimicrob Agents Chemother*, 49 (1) 26-31.
69. Johnson T. J., Wannemuehler Y. M., Johnson S. J., et al. (2007), "Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates", *Appl Environ Microbiol*, 73 (6) 1976-83.
70. Jorgensen J. H. & Pfaller M. A. (2015), *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, USA
71. Kaper J. B., Nataro J. P. & Mobley H. L. (2004), "Pathogenic *Escherichia coli*", *Nat Rev Microbiol*, 2 (2) 123-40.
72. Kawahara R., Fujiya Y., Yamaguchi T., et al. (2019), "Most domestic livestock possess colistin-resistant commensal *Escherichia coli* harboring *mcr* in a rural community in Vietnam", *Antimicrob Agents Chemother*,
73. Kim J. & Lee H. J. (2000), "Rapid discriminatory detection of genes coding for SHV beta-lactamases by ligase chain reaction", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44 (7) 1860-1864.
74. Kiratisin P., Apisarnthanarak A., Laesripa C. & Saifon P. (2008), "Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic", *Antimicrob Agents Chemother*, 52 (8) 2818-24.
75. Komatsu M., Aihara M., Shimakawa K., et al. (2003), "Evaluation of MicroScan ESBL confirmation panel for Enterobacteriaceae-producing, extended-spectrum

- beta-lactamases isolated in Japan", *Diagn Microbiol Infect Dis*,46 (2)125-30.
76. Koningstein M., Leenen M. A., Mughini-Gras L., et al. (2015),"Prevalence and Risk Factors for Colonization With Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* in Children Attending Daycare Centers: A Cohort Study in the Netherlands", *J Pediatric Infect Dis Soc*,4 (4)e93-9.
 77. Kumar D., Singh A. K., Ali M. R.&Chander Y. (2014),"Antimicrobial Susceptibility Profile of Extended Spectrum beta-Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* from Various Clinical Samples", *Infect Dis (Auckl)*,7 1-8.
 78. Li B., Sun J. Y., Liu Q. Z., et al. (2011),"High prevalence of CTX-M beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* strains from healthy humans in Fuzhou, China", *Scand J Infect Dis*,43 (3)170-4.
 79. Li X. M., Jang S. J., Bae I. K., et al. (2010),"[Frequency of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC beta-lactamase genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* over a three-year period in a University Hospital in Korea]", *Korean J Lab Med*,30 (6)616-23.
 80. Liao Kang, Chen Yili, Wang Menghe, et al. (2017),"Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* causing intra-abdominal infections from 9 tertiary hospitals in China", *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*,87 (1)45-48.
 81. Liu Y. Y., Wang Y., Walsh T. R., et al. (2016),"Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study", *Lancet Infect Dis*,16 (2)161-8.
 82. Livermore D. M., Struelens M., Amorim J., et al. (2002),"Multicentre evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System for interpretive reading of antimicrobial resistance tests", *J Antimicrob Chemother*,49 (2)289-300.
 83. M'Zali F. H., Heritage J., Gascoyne-Binzi D. M., Snelling A. M.&Hawkey P. M. (1998),"PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum beta-lactamase and to identify different SHV genes within the same strain", *J Antimicrob*

Chemother,41 (1)123-5.

84. Mabilat C. & Courvalin P. (1990), "Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae", *Antimicrob Agents Chemother*,34 (11)2210-6.
85. Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., et al. (2012), "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance", *Clin Microbiol Infect*,18 (3)268-81.
86. Maiden M. C. (2006), "Multilocus sequence typing of bacteria", *Annu Rev Microbiol*,60 561-88.
87. Malhotra-Kumar S., Xavier B. B., Das A. J., et al. (2016), "Colistin-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* isolated from food animals in Hanoi, Vietnam", *Lancet Infect Dis*,16 (3)286-7.
88. Marcadé Geraldine, Gautier Valérie, Arlet Guillaume, et al. (2008), "Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,63 (1)67-71.
89. Mashayekhi Fatemeh, Moghny Mandana, Faramarzpooor Motahare, et al. (2014), "Molecular Characterization and Antimicrobial Resistance of Uropathogenic *Escherichia coli*", *Iranian Journal of Biotechnology*,12 (2)32-40.
90. McGann P., Snesrud E., Maybank R., et al. (2016), "Escherichia coli Harboring *mcr-1* and *bla*CTX-M on a Novel IncF Plasmid: First Report of *mcr-1* in the United States", *Antimicrob Agents Chemother*,60 (7)4420-1.
91. Mnif B., Harhour H., Jdidi J., et al. (2013), "Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Tunisia and characterization of their virulence factors and plasmid addiction systems", *BMC Microbiol*,13 147.
92. Morrissey I., Hackel M., Badal R., et al. (2013), "A Review of Ten Years of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) from 2002 to

- 2011", *Pharmaceuticals (Basel)*,6 (11)1335-46.
93. Nakama R., Shingaki A., Miyazato H., et al. (2016),"Current status of extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* in Okinawa prefecture, Japan", *J Infect Chemother*,22 (5)281-6.
 94. Nakayama T., Jinnai M., Kawahara R., et al. (2017),"Frequent use of colistin-based drug treatment to eliminate extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in backyard chicken farms in Thai Binh Province, Vietnam", *Trop Anim Health Prod*,49 (1)31-37.
 95. Nakayama Tatsuya, Ueda Shuhei, Huong Bui Thi Mai, et al. (2015),"Wide dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in community residents in the Indochinese peninsula", *Infection and drug resistance*,8 1-5.
 96. Nemoy L. L., Kotetishvili M., Tigno J., et al. (2005),"Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates", *J Clin Microbiol*,43 (4)1776-81.
 97. Nhung N.T., Hoa N.M., Cuong N.V., et al. (2016),"Use of Colistin and Other Critical Antimicrobials on Pig and Chicken Farms in Southern Vietnam and Its Association with Resistance in Commensal *Escherichia coli* Bacteria", *Appl Environ Microbiol*,82 (13)3727-3735.
 98. Nicolas-Chanoine M. H., Gruson C., Bialek-Davenet S., et al. (2013),"10-Fold increase (2006-11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre", *J Antimicrob Chemother*,68 (3)562-8.
 99. Orden J. A., Ruiz-Santa-Quiteria J. A., Garcia S., Cid D.&De La Fuente R. (2000),"In vitro susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic dairy calves to 15 antimicrobial agents", *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*,47 (5)329-35.
 100. Partridge S. R., Kwong S. M., Firth N.&Jensen S. O. (2018),"Mobile Genetic

- Elements Associated with Antimicrobial Resistance", *Clin Microbiol Rev*,31 (4)
101. Paterson D. L. &Bonomo R. A. (2005),"Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update", *Clin Microbiol Rev*,18 (4)657-86.
 102. Phong L.Q., Ueda S., Hue N.T.N., et al. (2015),"Characteristics of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing Escherichia coli in Retail Meats and Shrimp at a Local Market in Vietnam", *Foodborne Pathog Dis*,12 (8)719-25.
 103. Phuong H.H., Awasthi S. P., N Phuc. D., et al. (2017),"Antimicrobial resistance profiles and molecular characterization of Escherichia coli strains isolated from healthy adults in Ho Chi Minh City, Vietnam", *J Vet Med Sci*,79 (3)479-485.
 104. Pitari G. M., Zingman L. V., Hodgson D. M., et al. (2003),"Bacterial enterotoxins are associated with resistance to colon cancer", *Proc Natl Acad Sci U S A*,100 (5)2695-9.
 105. PulseNet (2013),"Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157:H7, Escherichia coli non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri", <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>,
 106. Rozwandowicz M., Hordijk J., Mevius D. J., et al. (2018),"Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,73 (5)1121-1137.
 107. Sanders C. C., Peyret M., Moland E. S., et al. (2000),"Ability of the VITEK 2 advanced expert system To identify beta-lactam phenotypes in isolates of Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa", *J Clin Microbiol*,38 (2)570-4.
 108. Sangare S. A., Rondinaud E., Maataoui N., et al. (2017),"Very high prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in bacteriemic patients hospitalized in teaching hospitals in Bamako, Mali", *PLoS One*,12 (2)e0172652.
 109. Sasaki T., Hirai I., Niki M., et al. (2010),"High prevalence of CTX-M beta-

- lactamase-producing Enterobacteriaceae in stool specimens obtained from healthy individuals in Thailand", *J Antimicrob Chemother*, 65 (4)666-8.
110. Schoevaerdt D., Verroken A., Huang T. D., et al. (2012), "Multidrug-resistant bacteria colonization amongst patients newly admitted to a geriatric unit: a prospective cohort study", *J Infect*, 65 (2)109-18.
 111. Shacheraghi F. & Shakibaie M.R (2010), "Molecular Identification of ESBL Genes blaGES-1, blaVEB-1, blaCTX-M blaOXA-1, blaOXA-4, blaOXA-10 and blaPER-1 in Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Burn Patients by PCR, RFLP and Sequencing Techniques ", *Int J Biol life Sci*,
 112. Shukla I, Tiwari R & Agrawal M (2004), "Prevalence of extended spectrum - lactamase producing klebsiella pneumoniae in a tertiary care hospital", *Indian Journal of Medical Microbiology*, 22 (2)87-91.
 113. Smet A., Rasschaert G., Martel A., et al. (2011), "In situ ESBL conjugation from avian to human Escherichia coli during cefotaxime administration", *J Appl Microbiol*, 110 (2)541-9.
 114. Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V., et al. (1995), "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing", *Journal of clinical microbiology*, 33 (9)2233-2239.
 115. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2012), "SURVEILLANCE REPORT: Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012",
[https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Puications antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Puications_antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2012.pdf)
 116. Trung N. V., Phung L.V ., Chinh L. H. , Khanh N.G. & Weintraub A. (2005), "Detection and characterization of diarrheagenic Escherichia coli from young children in Hanoi, Vietnam", *J Clin Microbiol*, 43 (2)755-60.
 117. Tzelepi E., Magana Ch, Platsouka E., et al. (2003), "Extended-spectrum beta-lactamase types in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in two Greek

- hospitals", *Int J Antimicrob Agents*,21 (3)285-8.
118. Vaidya Sunil, Dvivedi Garima &Jadhav Santoshkumar (2011),"Cross-neutralization between three mumps viruses & mapping of haemagglutinin-neuraminidase (HN) epitopes", *Journal of Laboratory Physicians*,3 (1)37-42.
 119. Valenza G., Nickel S., Pfeifer Y., et al. (2014),"Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as intestinal colonizers in the German community", *Antimicrob Agents Chemother*,58 (2)1228-30.
 120. van der Donk Christina F. M., van de Bovenkamp Jeroen H. B., De Brauwier Els I. G. B., et al. (2012),"Antimicrobial Resistance and Spread of Multi Drug Resistant *Escherichia coli* Isolates Collected from Nine Urology Services in the Euregion Meuse-Rhine", *PLOS ONE*,7 (10)e47707.
 121. Villegas M. V., Blanco M. G., Sifuentes-Osornio J.&Rossi F. (2011),"Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America--2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART)", *Braz J Infect Dis*,15 (1)34-9.
 122. Walkty A., Karlowsky J. A., Adam H. J., et al. (2016),"Frequency of MCR-1-mediated colistin resistance among *Escherichia coli* clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals (CANWARD 2008-2015)", *CMAJ Open*,4 (4)E641-e645.
 123. Zhao R., Shi J., Shen Y., et al. (2015),"Phylogenetic Distribution of Virulence Genes Among ESBL-producing Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Long-term Hospitalized Patients", *J Clin Diagn Res*,9 (7)Dc01-4.
 125. Wang Yuan, Wu Jian &Cao Yi (2015),"The extended spectrum β -lactamases (ESBL) and virulence genes of intestinal enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) in healthy elderly individuals", *International journal of clinical and experimental medicine*,8 (11)20953-20958.
 126. Wilson G. &McCabe D. (2007),"The use of antibiotic-containing agars for the isolation of extended-spectrum β -lactamase-producing organisms in intensive

care units", *Clinical Microbiology and Infection*, 13 (4) 451-453.

127. World Health Organization (2014), "Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance",

PHỤ LỤC