

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**



**ĐINH THỊ THU HƯƠNG**

**NGHIÊN CỨU PCR ĐA MÔI TRƯỜNG CHẨN ĐOÁN SỚM  
TÁC NHÂN GÂY BỆNH VÀ HƯỚNG DẪN ĐIỀU TRỊ  
TRONG VIÊM PHỔI BỆNH VIỆN**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI - 2023**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**



**ĐINH THỊ THU HƯƠNG**

**NGHIÊN CỨU PCR ĐA MÔI TRƯỜNG CHẨN ĐOÁN SỚM  
TÁC NHÂN GÂY BỆNH VÀ HƯỚNG DẪN ĐIỀU TRỊ  
TRONG VIÊM PHỔI BỆNH VIỆN**

Chuyên ngành : Hồi sức cấp cứu và chống độc  
Mã số : 9720103

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

- 1. PGS.TS. Đỗ Ngọc Sơn**
- 2. GS.TS. Bùi Vũ Huy**

**HÀ NỘI - 2023**

## LỜI CẢM ƠN

*Để thực hiện thành công luận án này, tôi đã được giúp đỡ từ rất nhiều các thầy, các cô cùng với nhiều cá nhân và tập thể khác. Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới các thầy, các cô, các bạn đồng nghiệp đã giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu. Tôi xin trân trọng cảm ơn:*

*- Ban giám hiệu, Phòng đào tạo sau đại học trường Đại học Y Hà Nội đã luôn tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp tôi hoàn thành luận án.*

*- PGS.TS. Nguyễn Đạt Anh, PGS.TS. Đặng Quốc Tuấn, PGS.TS. Hà Trần Hưng cùng toàn thể các thầy, cô trong Bộ môn Hồi sức cấp cứu Trường Đại học Y Hà Nội đã động viên và giúp đỡ tôi.*

*- Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Đỗ Ngọc Sơn, GS.TS. Bùi Vũ Huy những người thầy đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và ủng hộ tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.*

*Tôi xin chân thành cảm ơn:*

*- Ban giám đốc, tập thể Khoa Hồi sức tích cực và Đơn nguyên Hồi sức tích cực ngoại Bệnh viện Thanh nhàn đã tạo điều kiện cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu. Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn tới các bệnh nhân điều trị tại Khoa Hồi sức tích cực nội, Đơn nguyên Hồi sức tích cực ngoại Bệnh viện Thanh Nhàn, Khoa Cấp cứu A9 bệnh viện Bạch Mai đã tham gia vào nghiên cứu để tôi có thể hoàn thành luận án này.*

*Đặc biệt tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới những người thân trong gia đình: bố, mẹ, anh chị, chồng, con đã luôn ở bên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu. Tôi xin ghi nhận, biết ơn những tình cảm và công lao ấy.*

*Hà Nội, ngày 08 tháng 04 năm 2023*

**Đinh Thị Thu Hương**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Đinh Thị Thu Hương, nghiên cứu sinh khóa 34, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Hồi sức cấp cứu và chống độc, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGs.Ts Đỗ Ngọc Sơn và Gs.Ts. Bùi Vũ Huy.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

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

*Hà Nội, ngày 08 tháng 04 năm 2023*

Người viết cam đoan

**Đinh Thị Thu Hương**

## DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Các chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
Ac	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Vi khuẩn <i>Acinetobacter baumannii</i>
ALI	Acute Lung Injury	Tổn thương phổi cấp
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome	Hội chứng suy hô hấp cấp tiến triển
ARR	Absolute risk reduce	Giảm nguy cơ tuyệt đối
ATS	American Thoracic Society	Hội lồng ngực Hoa Kỳ
AUC	Area Under the Curve	Diện tích dưới đường cong
BAL	Bronchoalveolar Lavage	Dịch rửa phế quản phế nang
BCTT/LP		Số lượng bạch cầu đa nhân trung tính/số lượng bạch cầu lympho
BMI	Body Mass Index	Chỉ số khối cơ thể
BN		Bệnh nhân
CDC	Centers for Disease Control and prevention	Trung tâm kiểm soát bệnh tật Hoa Kỳ
CĐ		Chẩn đoán
CFU	Colony Forming Units	Đơn vị khuẩn lạc
CPIS	Clinical Pulmonary Infection Score	Điểm viêm phổi
CR	Carbapenem resistant	Kháng thuốc carbapenem
CRE	Enterobacter carbapenem resistant	Enterobacter kháng carbapenem
CRP	C- reaction protein	Protein phản ứng C
Ct	Cycle Threshold	Chu kỳ ngưỡng
CTSN		Chấn thương sọ não
DNA	Acid Deoxyribonucleic	Phân tử di truyền

<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>	Vi khuẩn <i>Escherichia coli</i>
ETA	Endotracheal Aspirate	Dịch hút qua nội khí quản
FDA	Food and Drug Administration	Cơ quan quản lý dược phẩm Hoa Kỳ
FN	False negative	Âm tính giả
FP	False positive	Dương tính giả
ICU	Intensive Care Unit	Đơn vị hồi sức tích cực
IDSA	Infectious Diseases Society of America	Hội bệnh lý nhiễm trùng Hoa kỳ
<i>Kp</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Vi khuẩn <i>Klebsiella pneumoniae</i>
LR -	Likelihood ratio negative	Chỉ số khả dĩ âm
LR +	Likelihood ratio positive	Chỉ số khả dĩ dương
MDR	Multidrug- Resistant	Đa kháng thuốc
MIC	Minimal Inhibited Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MPCR	Multiplex realtime PCR	PCR đa môi
MRSA	Methicillin-Resistant Staphylococcus	Tụ cầu vàng kháng Methicillin
NNT	Number need to treat	Số bệnh nhân cần điều trị
NPV	Negative predict value	Giá trị dự đoán âm tính
<i>Pa</i>		Vi khuẩn <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi
PCT	Procalcitonin	Chỉ số sinh học của phản ứng viêm
PPV	Positive predict value	Giá trị dự đoán dương tính
PCT	Procalcitonin	Chỉ số sinh học của phản ứng viêm
PSB	Protected specimen brushing	Bệnh phẩm lấy bằng chổi quét có bảo vệ qua nội soi phế quản
RL		Rối loạn
RNA	Acid Ribonucleic	Phân tử di truyền
RRR	Relative risk reduce	Giảm nguy cơ tương đối

<i>Sa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Vi khuẩn <i>Staphylococcus aureus</i>
Se	Sensitivity	Độ nhạy
Sp	Specific	Độ đặc hiệu
TN	True negative	Âm tính thật
TLTV		Tỷ lệ tử vong
TP	True positive	Dương tính thật
TT		Tổn thương
VK		Vi khuẩn
VPBV		Viêm phổi bệnh viện
VPLQTM		Viêm phổi liên quan thở máy
XDR	Extensively Drug-Resistant	Kháng thuốc rộng rãi
YTNC		Yếu tố nguy cơ
WHO	World Health Organization	Tổ chức y tế thế giới

# MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....</b>	<b>3</b>
1.1. Tổng quan về viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy: .....	3
1.1.1. Định nghĩa viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy: 3	
1.1.2. Dịch tễ học viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy: 3	
1.1.3. Chẩn đoán viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy: 5	
1.1.4. Căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy .....	10
1.1.5. Sử dụng kháng sinh trong điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy .....	11
1.1.6. Ngày nằm viện và chi phí điều trị của viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy .....	12
1.1.7. Điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy ....	12
1.2. Các kỹ thuật vi sinh chẩn đoán căn nguyên gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy .....	14
1.2.1. Kỹ thuật nhuộm soi trực tiếp: .....	14
1.2.2. Các kỹ thuật nuôi cấy vi khuẩn thông thường:.....	14
1.2.3. Các phương pháp định danh vi khuẩn .....	15
1.3. Tổng quan về quantitative multiplex realtime PCR.....	16
1.3.1. Vài nét về PCR.....	16
1.3.2. Nguyên lý kỹ thuật PCR: .....	17
1.3.3. Realtime PCR và Classical PCR.....	17
1.3.4. Multiplex PCR (PCR đa môi):.....	19
1.3.5. Quantitative multiplex realtime PCR .....	19



1.4. Tình hình nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật multiplex realtime PCR trong viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy.....	20
1.4.1. Tình hình nghiên cứu multiplex realtime PCR ở Việt nam.....	20
1.4.2. Tình hình nghiên cứu multiplex realtime PCR trong viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máytrên thế giới.....	22
1.5. Chiến lược sử dụng kháng sinh điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy.....	27
1.5.1. Các căn cứ cơ sở lựa chọn và sử dụng kháng sinh hợp lý điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy .....	27
1.5.2. Một số phác đồ kháng sinh cụ thể điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy .....	36
<b>CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>39</b>
2.1. Đối tượng nghiên cứu .....	39
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu .....	39
2.1.2. Địa điểm nghiên cứu.....	43
2.1.3. Thời gian nghiên cứu .....	43
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	43
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu .....	43
2.2.2. Tiêu chí đánh giá của nghiên cứu .....	44
2.2.3. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu .....	45
2.3. Tiến hành nghiên cứu.....	57
2.3.1. Quy trình nghiên cứu.....	57
2.3.2. Phác đồ điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy áp dụng trong nghiên cứu .....	59
2.3.3. Thu thập số liệu nghiên cứu.....	63
2.3.4. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu.....	66

<b>CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>69</b>
3.1. Đặc điểm chung của hai nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu.....	69
3.1.1. Đặc điểm chung lúc nhập viện.....	69
3.1.2. Một số đặc điểm lâm sàng , cận lâm sàng thời điểm chẩn đoán viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy .....	71
3.1.3. Các yếu tố liên quan đến tỷ lệ tử vong trong nghiên cứu .....	82
3.2. Giá trị multiplex realtime PCR trong chẩn đoán viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy .....	85
3.3. Phân tích vai trò của multiplex realtime PCR trong điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy.....	92
3.3.1. Sử dụng kháng sinh phù hợp thời điểm chẩn đoán viêm phổi .	92
3.3.2. Thời gian thở máy, thời gian nằm viện điều trị của hai nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu .....	93
3.3.3. Tỷ lệ tử vong của các bệnh nhân trong nghiên cứu.....	94
3.3.4. Số bệnh nhân cần áp dụng multiplex realtime PCR để giảm một bệnh nhân tử vong do viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy.....	95
<b>CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN .....</b>	<b>96</b>
4.1. Đặc điểm chung của hai nhóm bệnh nhân nghiên cứu: .....	96
4.1.1. Đặc điểm chung lúc nhập viện:.....	96
4.1.2. Đặc điểm các bệnh lý đi kèm.....	98
4.1.3. Một số đặc điểm lâm sàng của hai nhóm.....	99
4.1.4. Một số đặc điểm cận lâm sàng thời điểm chẩn đoán viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy.....	100
4.1.5. Các yếu tố liên quan đến tỷ lệ tử vong do viêm phổi trong nghiên cứu.....	106
4.2. Giá trị multiplex realtime PCR trong chẩn đoán viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy .....	111

4.2.1. So sánh khả năng phát hiện 5 loại vi khuẩn gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy.....	111
4.2.2. Sự phù hợp kết quả giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy đối với 5 loại vi khuẩn gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy .....	116
4.2.3. Giá trị chẩn đoán của multiplex realtime PCR với từng loại vi khuẩn trong viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy	118
4.2.4. Giá trị chẩn đoán của multiplex realtime PCR trong viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy do 5 loại vi khuẩn gây bệnh thường gặp .....	119
4.3. Phân tích vai trò của multiplex realtime PCR trong điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy.....	121
4.3.1. Sử dụng kháng sinh phù hợp .....	121
4.3.2. Thời gian thở máy, thời gian điều trị, tỷ lệ tử vong do viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy của hai nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu .....	123
4.3.3. Số bệnh nhân cần áp dụng multiplex realtime PCR để giảm một bệnh nhân tử vong do viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy .....	126
<b>KẾT LUẬN.....</b>	<b>128</b>
<b>KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>130</b>
<b>CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN</b>	
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Ngưỡng chẩn đoán viêm phổi của các mẫu bệnh phẩm .....	8
Bảng 1.2. Tổng hợp các yếu tố nguy cơ mắc phải các vi khuẩn đa kháng .....	27
Bảng 2.1. Trình tự Primer-Probe sử dụng trong nghiên cứu .....	52
Bảng 2.2. Danh sách các chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu ....	53
Bảng 2.3. Trình tự các amplicon được sử dụng trong nghiên cứu.....	54
Bảng 2.4. Lựa chọn kháng sinh dựa trên kết quả multiplex realtime PCR ...	61
Bảng 2.5. Diễn giải kết quả tính giá trị chẩn đoán của multiplex realtime PCR ..	65
Bảng 3.1. Đặc điểm chung lúc nhập viện của hai nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu.....	69
Bảng 3.2. Một số đặc điểm lâm sàng .....	71
Bảng 3.3. Một số đặc điểm xét nghiệm máu.....	72
Bảng 3.4. Đặc điểm khí máu động mạch .....	73
Bảng 3.5. Tổn thương trên phim XQ ngực- cắt lớp vi tính ngực .....	74
Bảng 3.6. Kết quả nuôi cấy vi sinh bệnh phẩm đường hô hấp của bệnh nhân trong nghiên cứu .....	75
Bảng 3.7. Phân tích các yếu tố liên quan đến tỷ lệ tử vong ở cả hai nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu .....	82
Bảng 3.8. Phân tích các yếu tố liên quan đến tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân nhóm nghiên cứu.....	83
Bảng 3.9. Phân tích các yếu tố liên quan đến tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân nhóm chứng.....	84
Bảng 3.10. So sánh khả năng phát hiện 5 loại vi khuẩn giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy.....	85
Bảng 3.11. So sánh tỷ lệ phát hiện một loại vi khuẩn giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy .....	86

Bảng 3.12. So sánh tỷ lệ phát hiện hai loại vi khuẩn giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy .....	87
Bảng 3.13. So sánh tỷ lệ phát hiện ba loại vi khuẩn giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy .....	88
Bảng 3.14. Sự phù hợp kết quả giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy đối với 5 loại vi khuẩn.....	89
Bảng 3.15. Giá trị chẩn đoán của multiplex realtime PCR đối với từng loại vi khuẩn.....	90
Bảng 3.16. Giá trị chẩn đoán multiplex realtime PCR chung cho cả 5 loại vi khuẩn.....	91
Bảng 3.17. So sánh việc sử dụng kháng sinh phù hợp khi có kết quả multiplex realtime PCR giữa hai nhóm nghiên cứu.....	92
Bảng 3.18. So sánh thời gian thở máy, thời gian nằm khoa hồi sức, thời gian nằm viện điều trị trong nghiên cứu.....	93
Bảng 3.19. So sánh tỷ lệ tử vong của bệnh nhân hai nhóm nghiên cứu .....	94
Bảng 3.20. Số bệnh nhân cần áp dụng multiplex realtime PCR để giảm một bệnh nhân tử vong do viêm phổi liên quan thở máy .....	95
Bảng 4.1. So sánh kết quả điều trị của nhóm can thiệp với các nghiên cứu ở Việt nam trong thời gian gần đây .....	125

## DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 1.1. Đường khuếch đại ghi nhận cường độ huỳnh quang phát ra từ ống phản ứng khi nhận được ánh sáng kích thích tương ứng với từng chu kỳ nhiệt. ....	18
Biểu đồ 1.2. Biểu đồ kết quả multilex realtime PCR .....	19
Biểu đồ 3.1. Phân bố tỷ lệ các bệnh lý đi kèm và các yếu tố ảnh hưởng đến hệ miễn dịch của BN trong nghiên cứu .....	70
Biểu đồ 3.2. Tỷ lệ phân bố kết quả nuôi cấy 5 loại vi khuẩn ở 2 nhóm nghiên cứu.....	76
Biểu đồ 3.3. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	77
Biểu đồ 3.4. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của <i>Klebsiella pneumonia</i> .....	78
Biểu đồ 3.5. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	79
Biểu đồ 3.6. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của <i>Escherichia coli</i> .....	80
Biểu đồ 3.7. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của <i>Staphylococcus aureus</i> .....	81

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Thở máy là một trong những kỹ thuật không thể thiếu trong hồi sức cấp cứu. Những bệnh nhân phải thở máy đa số là những bệnh nhân rất nặng, có nhiều bệnh phối hợp cần phải có thời gian thở máy để duy trì sự sống. Mặc dù có rất nhiều tiến bộ trong việc sử dụng các biện pháp phòng ngừa, các trang thiết bị và phương tiện chăm sóc, các phác đồ điều trị kháng sinh cập nhật nhưng thở máy vẫn có nguy cơ cao dẫn đến viêm phổi liên quan đến thở máy (VPLQTM) và VPLQTM vẫn là một nguyên nhân quan trọng làm gia tăng tỷ lệ tử vong, làm phức tạp quá trình điều trị bệnh lý nên <sup>1</sup>.

VPLQTM bản chất là một viêm phổi bệnh viện (VPBV) xuất hiện ở những bệnh nhân phải thở máy xâm nhập qua ống nội khí quản (hoặc canuyn mở khí quản)  $\geq 48$  giờ ở các đơn vị hồi sức tích cực và có tỷ lệ tử vong cao. Ngoài ra, VPLQTM cũng sẽ dẫn đến nhiễm khuẩn huyết, sốc nhiễm khuẩn, hội chứng suy hô hấp cấp tiến triển ARDS <sup>2,3,4</sup>. Tiên lượng xấu ở bệnh nhân VPLQTM đã được báo cáo trong nhiều năm qua và chi phí bệnh viện trung bình cho mỗi bệnh nhân tăng 40.000 đô la Mỹ <sup>5</sup>.

Điều trị VPLQTM thì cơ bản là sử dụng kháng sinh, việc sử dụng kháng sinh phải càng sớm càng tốt, đặc biệt nếu có sốc nhiễm khuẩn, để cải thiện tiên lượng người bệnh, rút ngắn thời gian thở máy. Mặt khác, việc định hướng vi khuẩn, lựa chọn kháng sinh cũng ảnh hưởng không nhỏ đến kết quả điều trị, nếu sử dụng kháng sinh không phù hợp có thể kéo dài thời gian điều trị và thậm chí tăng tỷ lệ tử vong lên gấp đôi <sup>6</sup>.

Việc lựa chọn kháng sinh để điều trị theo kinh nghiệm VPBV-VPLQTM đang là vấn đề vô cùng khó khăn trong khi thực tế có sự gia tăng đáng báo động tình trạng vi khuẩn kháng thuốc ở các đơn vị Hồi sức tích cực. Thông thường định hướng sử dụng kháng sinh trên lâm sàng kinh điển sẽ dựa trên kết quả gợi ý từ việc nhuộm soi bệnh phẩm đờm lấy mẫu ở đầu xa, ở dịch

rửa phế quản phế nang, tuy nhiên vì độ nhạy và độ đặc hiệu thấp nên hiện nay không còn sử dụng nữa <sup>7,8</sup>. Chẩn đoán chính xác loại vi khuẩn gây VPBV-VPLQTM thường dựa trên nuôi cấy truyền thống, phương pháp này cần thời gian dài (24 – 72 giờ) và có độ nhạy thấp nên nếu chờ kết quả để điều trị kháng sinh thì thường chậm so với đòi hỏi của lâm sàng. Vì vậy, cần có một kỹ thuật có độ nhạy cao, thời gian trả lời kết quả ngắn, hiện nay đó chính là kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction- phản ứng chuỗi). Kỹ thuật này có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, nó chỉ đòi hỏi từ 4- 6 giờ là đã có thể biết tương đối chính xác căn nguyên vi khuẩn gây bệnh <sup>6</sup>. Thêm nữa, là nó có thể phát hiện từ những mẫu ADN hoặc mẫu ARN rất nhỏ chứ không cần vi khuẩn sống ngay cả khi bệnh nhân đã và đang điều trị kháng sinh. Với đặc thù hệ vi sinh vật đường hô hấp đa dạng- phức tạp nên trong nghiên cứu này, chúng tôi áp dụng multiplex realtime PCR (PCR đa môi định lượng) để có thể khẳng định căn nguyên gây bệnh căn cứ vào số lượng bản sao có trong mẫu bệnh phẩm ban đầu. Chiếm tỷ lệ cao thường gặp ở các khoa Hồi sức tích cực là các vi khuẩn *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* <sup>9,10,11,12,13,14</sup>. Do đó nghiên cứu của chúng tôi sẽ tập trung phát hiện 5 căn nguyên vi khuẩn thường gặp gây VPBV, VPLQTM này.

Ở Việt nam đã có rất nhiều nghiên cứu về PCR trong các nhóm bệnh lý khác nhau nhưng chưa thực sự có nghiên cứu nào áp dụng multiplex realtime PCR để chẩn đoán nhanh vi khuẩn thường gặp gây VPBV, VPLQTM, vì vậy chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm mục tiêu:

- 1. Nghiên cứu giá trị của multiplex realtime PCR trong chẩn đoán tác nhân gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy.**
- 2. Phân tích vai trò của multiplex realtime PCR trong theo dõi điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy.**



## CHƯƠNG 1

### TỔNG QUAN

#### **1.1. Tổng quan về viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy:**

##### ***1.1.1. Định nghĩa viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy:***

Theo Tổ chức y tế thế giới (WHO) 2002, “Viêm phổi bệnh viện là tình trạng nhiễm khuẩn trong thời gian nằm viện và không có bệnh hoặc ủ bệnh lúc nhập viện”<sup>15</sup>.

Theo Hội lồng ngực Hoa kỳ (ATS)/Hội bệnh lý nhiễm trùng (IDSA) 2016 đã thống nhất định nghĩa viêm phổi bệnh viện (VPBV) của ATS/IDSA 2005 là sự xuất hiện sau 48 giờ nhập viện “thâm nhiễm mới ở phổi do nhiễm trùng bao gồm sốt mới xuất hiện, đờm mủ, tăng bạch cầu và giảm oxy hóa máu”. VPLQTM là VPBV xuất hiện sau 48 giờ kể từ khi BN được đặt ống nội khí quản<sup>16,17,18</sup>. Mặt khác, ATS/IDSA cũng khẳng định VPBV, VPLQTM là bệnh lý nhiễm khuẩn bệnh viện nặng và thường gặp nhất trong tất cả các loại nhiễm khuẩn bệnh viện. VPBV, VPLQTM làm tăng chi phí điều trị, thời gian nằm viện, thời gian thở máy và tỷ lệ tử vong<sup>18,19,20</sup>.

##### ***1.1.2. Dịch tễ học viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy:***

###### ***1.1.2.1. Tỷ lệ mắc viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy:***

Viêm phổi bệnh viện (VPBV) 2014 đứng hàng thứ hai trong các nhiễm khuẩn bệnh viện thường gặp ở Mỹ, chỉ sau nhiễm khuẩn tiết niệu<sup>21</sup>. Mặt khác nghiên cứu cũng cho thấy VPBV xảy ra ở 150.000- 200.000 BN mỗi năm, cứ 1000 BN nhập viện có 5- 10 BN bị VPBV. Đối với BN nằm ở đơn vị điều trị tích cực VPBV chiếm 25% trong số các nhiễm khuẩn bệnh viện, ở BN có đặt nội khí quản VPBV xảy ra 9- 27%<sup>21</sup>. Một nghiên cứu mới tại Mỹ 2018 cho thấy tần suất mắc VPBV là 3,63/1000 ngày điều trị. Và tất nhiên nhóm BN

này đẩy chi phí điều trị lên cao, thời gian nằm viện kéo dài, tỷ lệ tử vong cũng cao hơn khi so sánh với các nhóm BN khác, ngoại trừ nhóm VPLQTM<sup>22</sup>.

Theo Trung tâm kiểm soát bệnh tật Hoa Kỳ (CDC) kết nối các nghiên cứu đã ước tính rằng có hơn 300.000 BN được thở máy mỗi năm, những BN này có nguy cơ cao bị biến chứng và tiên lượng xấu kể cả tử vong (VPLQTM được xếp vào loại biến chứng này). Trong năm 2012, tỷ lệ mắc VPLQTM ở Hoa Kỳ dao động từ 0,0- 4,4/1000 ngày thở máy<sup>2</sup>.

Tại Pháp (2017), VPLQTM vẫn là một trong nhiễm khuẩn đứng thứ hai và dẫn đầu nguyên nhân gây tử vong do nhiễm khuẩn bệnh viện. Tỷ lệ mắc VPLQTM dao động từ 5%- 67%. Nguy cơ ước tính bị VPLQTM là 1,5%/ngày thở máy và giảm xuống dưới 0,5%/ngày sau ngày thứ 14 của thông khí nhân tạo<sup>23</sup>. Iran tỷ lệ VPLQTM là 8%/ năm<sup>24</sup>. Abdelrazik Otman (Cairo Hy lạp- 2017) tỷ lệ mắc VPLQTM là 35,4%<sup>25</sup>.

Châu Á, báo cáo từ 1999- 2017 ở 22 quốc gia, tần suất mắc VPLQTM ước tính chung là 15,1/1000 ngày thở máy (95% CI là 12,1- 18,0). Tỷ lệ VPLQTM chung cho cả nghiên cứu 12,7%; trong đó tần suất mắc VPLQTM cao nhất là ở Mông cổ (43,7/1000 ngày thở máy) và tỷ lệ mắc VPLQTM cao nhất ở Hồng Kông (48,1%)<sup>26</sup>. Ở Trung Quốc, phân tích gộp tổng kết 195 nghiên cứu từ 2010- 2015 cho thấy tần suất mắc VPLQTM ở nước này là 22,83/1000 ngày thở máy và tỷ lệ mắc VPLQTM tích lũy gộp chung là 23,8%<sup>27</sup>.

Ở khoa Điều trị tích cực bệnh viện Bạch mai, tỷ lệ VPLQTM cũng giảm dần theo thời gian: Nguyễn Việt Hùng (2008) 63,5/1000 ngày thở máy; Nguyễn Ngọc Quang (2011): 46/1000 ngày thở máy; Hà Sơn Bình (2015): 24,8/1000 ngày thở máy; Hoàng Khánh Linh (2018): 24,5/1000 ngày thở máy<sup>28</sup>. Năm 2017, Vũ Đình Phú và cộng sự đã thực hiện một nghiên cứu tiến hành ở 15 khoa hồi sức tích cực, 14 đơn vị cấp cứu ở 6 bệnh viện hạng III và 8 bệnh

viện tuyến tính, kết quả nghiên cứu nhìn chung tỷ lệ nhiễm khuẩn bệnh viện là 30,5%. Tỷ lệ VPLQTM chiếm 91,6% trong số bệnh nhân có thực hiện các kỹ thuật xâm nhập <sup>12</sup>.

#### ***1.1.2.2. Tỷ lệ tử vong do viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy:***

Có rất nhiều nghiên cứu từ những thập niên trước nhằm mục đích nghiên cứu mức độ nghiêm trọng của nhiễm khuẩn bệnh viện, đặc biệt là VPBV hay là VPLQTM (viêm phổi có dụng cụ can thiệp vào đường hô hấp của người bệnh). Kết cục xấu nhất là tử vong do VPBV, VPLQTM.

Tỷ lệ tử vong do VPBV, VPLQTM tăng đều hàng năm đối với các nước thu nhập thấp, không giảm hoặc giảm chậm trong thập kỷ này ở các nước thu nhập cao. Và tỷ lệ tử vong do VPBV, VPLQTM phụ thuộc vào nhiều yếu tố, khác nhau ở mỗi đơn vị Hồi sức tích cực và mỗi nghiên cứu.

Theo CDC Hoa kỳ năm 2012, thì tỷ lệ tử vong chỉ tính riêng ở những BN bị biến chứng tổn thương phổi cấp tính khi thở máy từ 24% ở người 15-19 tuổi đến 60% ở những bệnh nhân 85 tuổi trở lên <sup>2</sup>. Tại Thổ Nhĩ Kỳ (2019) tỷ lệ tử vong trên BN VPLQTM thô chiếm 39,8% <sup>29</sup>. Trung quốc (2020), tỷ lệ tử vong trong vòng 30 ngày ở BN VPLQTM là 42,7% <sup>29</sup>. Tại khoa Điều trị tích cực bệnh viện Bạch mai ở những BN được chẩn đoán xác định VPLQTM, tỷ lệ tử vong của những nghiên cứu gần đây giảm dần theo thời gian: Hà Sơn Bình (2015) là 42% <sup>30</sup>, Hoàng Khánh Linh (2018) là 34,6% <sup>28</sup>; một nghiên cứu khác cũng ở khoa Điều trị tích cực bệnh viện Bạch mai, tỷ lệ tử vong do VPLQTM ở ngày điều trị thứ bảy là 13% và ở ngày thứ 31 là 43,1% <sup>31</sup>.

#### ***1.1.3. Chẩn đoán viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy:***

VPBV, VPLQTM được chẩn đoán bằng cách phối hợp các triệu chứng lâm sàng, xét nghiệm và các triệu chứng trên phim XQuang ngực. Chẩn đoán viêm phổi ở những BN đang thở máy thường là khó khăn vì các triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng không đặc hiệu cho VPLQTM, ngay cả khi đã có bất

thường trên phim XQuang ngực<sup>32,33</sup>. Chẩn đoán VPLQTM phải đạt cùng lúc hai mục tiêu: **chẩn đoán sớm**, không bỏ sót, để lựa chọn được kháng sinh phù hợp, điều trị kịp thời; đồng thời **không chẩn đoán quá mức** dẫn đến sử dụng kháng sinh không cần thiết, làm tăng độc tính cho BN, tăng chi phí điều trị và điều nguy hại hơn cả là góp phần làm tăng tính kháng kháng sinh của vi khuẩn. Chính vì vậy phương pháp chẩn đoán VPLQTM cần vừa có độ nhạy cao, vừa có độ đặc hiệu tốt. Cho đến hiện nay tiêu chuẩn xác định VPLQTM của CDC cơ bản đáp ứng được đòi hỏi này.

Để chẩn đoán VPBV, VPLQTM phần lớn đều dựa vào các triệu chứng lâm sàng như: tăng hoặc giảm thân nhiệt, tăng số lượng và thay đổi màu sắc của dịch tiết phế quản, tăng hoặc giảm số lượng bạch cầu trong máu ngoại vi, giảm oxy hóa máu nếu nặng có thể chuyển thành hội chứng suy hô hấp cấp tiến triển<sup>33,34,35</sup>. Tuy nhiên, các dấu hiệu của nhiễm khuẩn như sốt, nhịp tim nhanh, tăng bạch cầu lại không đặc hiệu và có thể xảy ra do nhiều nguyên nhân khác có gia tăng giải phóng cytokine trong máu<sup>18</sup>.

#### **1.1.3.1. Chẩn đoán viêm phổi bệnh viện theo CDC:**

Trung tâm kiểm soát bệnh dịch Hoa kỳ CDC 2018 đã đưa ra một bảng các tiêu chuẩn chẩn đoán VPBV gồm **ít nhất một triệu chứng**<sup>36</sup>:

Sốt ( $>38^{\circ}$  hoặc  $> 100.4^{\circ}$  F);

Giảm bạch cầu ( $\leq 4000\text{BC}/\text{mm}^3$ ) hoặc tăng bạch cầu ( $\geq 12000\text{BC}/\text{mm}^3$ )

Thay đổi tình trạng ý thức với người lớn  $\geq 70$  tuổi mà không tìm được bất cứ nguyên nhân nào khác.

**và ít nhất hai triệu chứng:**

Xuất hiện đờm mủ mới hoặc thay đổi tính chất đờm, tăng số lượng đờm hoặc tăng số lần phải hút đờm;

Ho khởi phát mới hoặc ho nặng hơn hoặc khó thở, thở nhanh

Nghe thấy ran ở phổi hoặc ran ở khí phế quản; độ bão hòa oxy máu giảm, tỷ lệ PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> giảm, tăng nhu cầu oxy.

### **1.1.3.2. Chẩn đoán viêm phổi liên quan thở máy theo CDC:**

Theo CDC có ba cách tiếp cận chẩn đoán VPLQTM đó là: VPLQTM lâm sàng; VPLQTM có bằng chứng vi sinh, và VPLQTM ở BN suy giảm miễn dịch<sup>36</sup>.

#### **Tiêu chuẩn chẩn đoán VPLQTM dựa trên các biểu hiện lâm sàng:**

##### **\* Hình ảnh X-quang:**

Có từ 2 phim X-quang lồng ngực trở lên, hoặc chỉ cần một phim nếu BN không có các bệnh nền ở phổi hoặc tim (như suy hô hấp, loạn sản phế quản phổi, phù phổi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính) với ít nhất 1 trong các tiêu chuẩn sau:

- Thâm nhiễm mới hoặc thâm nhiễm tiến triển và hằng định.
- Tổn thương đồng đặc.
- Tổn thương hang.
- Hình ảnh ú khí ở trẻ  $\leq 1$  tuổi.

##### **\* Lâm sàng:**

**Với mọi lứa tuổi, ít nhất một triệu chứng sau:**

- Sốt ( $> 38^{\circ}\text{C}$ ) không có nguyên nhân khác.
- Giảm bạch cầu ( $\leq 4000/\text{mm}^3$ ) hoặc tăng bạch cầu ( $\geq 12000/\text{mm}^3$ )
- Thay đổi tình trạng ý thức ở người  $\geq 70$  tuổi mà không tìm được bất cứ nguyên nhân nào khác.

**Và ít nhất có hai triệu chứng sau:**

- Xuất hiện đờm mủ mới hoặc thay đổi tính chất đờm, tăng số lượng đờm hoặc tăng số lần phải hút đờm;
- Xuất hiện ho khởi phát mới hoặc ho nặng hơn, khó thở, hoặc thở nhanh.
- Nghe thấy ran ở phổi hoặc ran phế quản.

- Độ bão hòa oxy giảm ; PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ≤ 240 giảm; nhu cầu oxy tăng hoặc tăng phụ thuộc máy thở.

\* Các xét nghiệm vi sinh vật <sup>36</sup>:

Trung tâm kiểm soát nhiễm khuẩn Hoa kỳ (CDC) 2018 đã đưa ra ngưỡng giá trị chẩn đoán viêm phổi của các mẫu bệnh phẩm nuôi cấy như sau:

**Bảng 1.1.** Ngưỡng chẩn đoán viêm phổi của các mẫu bệnh phẩm

Kỹ thuật lấy bệnh phẩm	Ngưỡng giá trị chẩn đoán
Mô phổi	>10 <sup>4</sup> cfu/g mô
Nội soi lấy bệnh phẩm	
Bơm rửa phế quản phế nang	>10 <sup>4</sup> cfu/ml
Bơm rửa phế quản phế nang có bảo vệ	>10 <sup>4</sup> cfu/ml
Lấy bệnh phẩm bằng chổi quét qua nội soi	>10 <sup>3</sup> cfu/ml
Lấy bệnh phẩm không dùng nội soi (mù)	
Bơm rửa phế quản phế nang (mù)	>10 <sup>4</sup> cfu/ml
Lấy bệnh phẩm bằng chổi quét (mù)	>10 <sup>3</sup> cfu/ml

\* Trong đó cfu (colony forming units): đơn vị khuẩn lạc.

Năm 2018, CDC đã phân tích, ngoài kết hợp các triệu chứng lâm sàng, XQuang ngực thì cần phối hợp ít nhất một tiêu chuẩn vi sinh sau <sup>36</sup>:

Vi sinh vật được xác định từ máu.

Vi sinh vật được xác định từ dịch màng phổi.

Nuôi cấy định lượng hoặc bán định lượng dương tính từ mẫu dịch rửa phế quản (mini Bronchoalveolar lavage – mini BAL) hoặc bệnh phẩm từ chổi quét có bảo vệ (Protected specimen brushing- PSB) hoặc dịch hút từ khí quản.

Quan sát trên kính hiển vi điện tử dịch rửa phế quản (Bronchoalveolar lavage –BAL) có ≥ 5% các tế bào thu được chứa vi khuẩn nội bào (ví dụ: vi khuẩn Gram âm).

Kết quả dương tính khi nuôi cấy định lượng hoặc bán định lượng nhu mô phổi.

Mô bệnh học cho thấy ít nhất một trong các chứng cứ sau đây của viêm phổi: sự hình thành hoặc tập trung rất nhiều bạch cầu đa nhân tại phế quản và các túi phế nang; có sự bằng chứng của sự xâm nhập các sợi nấm vào nhu mô phổi.

### ***1.1.3.3. Chẩn đoán viêm phổi liên quan thở máy theo ATS/IDSA 2016:***

Chẩn đoán VPLQTM được đặt ra nếu phim XQuang phổi BN có thâm nhiễm mới và tiến triển, các dấu hiệu lâm sàng gợi ý nhiễm khuẩn bao gồm: sốt, xuất hiện đờm mủ mới, tăng bạch cầu và giảm oxy hóa máu cấy đờm hoặc dịch hút nội khí quản dương tính (kể cả khi XQuang phổi không có nốt thâm nhiễm mới) <sup>37</sup>.

Năm 2016, Hội lồng ngực Mỹ và Hiệp hội các bệnh lý nhiễm trùng Mỹ đã đưa ra một hướng dẫn mới trong chẩn đoán và điều trị VPLQTM. Hướng dẫn này thay đổi và bổ sung phiên bản 2005 gồm những điểm chính sau <sup>18</sup>:

Thống nhất các tiêu chuẩn chẩn đoán chính về XQuang ngực, các triệu chứng lâm sàng (sốt, đờm mủ, tăng bạch cầu..)

Thay đổi cách mức độ đánh giá, phân loại để hướng dẫn chẩn đoán và điều trị dựa trên bằng chứng sẵn có.

Loại bỏ khái niệm viêm phổi liên quan chăm sóc y tế.

Đối với các phương pháp vi sinh vật để chẩn đoán VPLQTM: gợi ý nên sử dụng lấy mẫu bệnh phẩm đường hô hấp không xâm nhập và nuôi cấy theo phương pháp bán định lượng (khuyến cáo yếu, mức độ bằng chứng thấp).

Đối với BN nghi ngờ VPLQTM khuyến cáo chỉ nên sử dụng các tiêu chí lâm sàng kết hợp procalcitonin để quyết định điều trị kháng sinh (khuyến cáo mạnh, mức độ bằng chứng vừa phải).

Đối với BN nghi ngờ VPLQTM khuyến cáo chỉ nên sử dụng các tiêu chí lâm sàng không nên sử dụng tiêu chí lâm sàng kết hợp CRP để quyết định điều trị kháng sinh (khuyến cáo yếu, mức độ bằng chứng vừa thấp).

Đối với BN nghi ngờ VPLQTM khuyến cáo chỉ nên sử dụng các tiêu chí lâm sàng không nên sử dụng tiêu chí lâm sàng kết hợp với bằng điểm viêm phổi CPIS để quyết định điều trị kháng sinh (khuyến cáo yếu, mức độ bằng chứng thấp).

#### **1.1.4. Căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy**

Loại VK gây ra VPBV, VPLQTM thường phụ thuộc thời gian ở BV, thời gian thở máy. VPLQTM sớm (< 5 ngày) VK gây bệnh thường là nhạy cảm kháng sinh. VPLQTM khởi phát muộn ( $\geq 5$  ngày) thường là do VK đa kháng và sẽ gặp khó khăn hơn trong việc điều trị bệnh. Thông thường, VK gây ra VPLQTM sớm bao gồm: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* còn nhạy cảm với Methicillin, trực khuẩn Gram âm đường ruột như *Escherichia coli*, *Klebsiella* gây viêm phổi, các loài *Enterobacter*, các loài *Proteus* và *Serratia marcescens*. Thủ phạm gây VPLQTM muộn gồm: *Staphylococcus aureus* kháng với Methicillin, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, và VK kháng beta-lactamaza sinh ESBL phổ rộng kháng thuốc trên diện rộng (XDR). Các VK gây bệnh này chiếm gần 80% tổng số các đợt VPLQTM<sup>38,39</sup>.

*Staphylococcus aureus* vẫn được xếp hạng là VK gây bệnh số một ở Mỹ (27,5–36,3%), nhiều nước trong Liên minh Châu Âu (23%)<sup>39,40</sup>, Hàn Quốc và Singapore<sup>18</sup>. Trái ngược hoàn toàn, ở châu Á gồm Trung Quốc, Thái Lan và Đài Loan và cả Việt nam, VPLQTM thường do các trực khuẩn Gram âm, bao gồm *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* đều vượt quá tỷ lệ lưu hành của *Staphylococcus aureus*<sup>28,41,30</sup>.



VPLQTM có thể do nhiều loại VK gây ra, tuy nhiên VPLQTM do nấm và vi rút có tỷ lệ rất thấp, đặc biệt với những người có hệ miễn dịch bình thường<sup>12,32,42,43,44,45</sup>.

### ***1.1.5. Sử dụng kháng sinh trong điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy***

Các VK chính gây VPBV, VPLQTM thay đổi ở từng quốc gia và thậm chí ở từng BV khác nhau trong cùng một quốc gia, vì vậy không thể có một khuyến cáo điều trị kháng sinh theo kinh nghiệm chung cho tất cả<sup>46</sup>. Sự lựa chọn kháng sinh theo kinh nghiệm có thể ảnh hưởng đáng kể đến tiên lượng BN khi mà VK gây bệnh kháng thuốc nhiều. *Định nghĩa điều trị kháng sinh không phù hợp là sự sử dụng kháng sinh mà vi khuẩn đã kháng lại kháng sinh đó hoặc thất bại điều trị khi mà kháng sinh đã phủ được vi khuẩn gây bệnh*<sup>46</sup>. Mặt khác, dùng kháng sinh phù hợp nhưng chậm trễ 2- 3 ngày cũng có thể là quá muộn đối với nhiều bệnh nhân. Ngoài việc cân nhắc lựa chọn kháng sinh phù hợp, bao phủ được VK gây bệnh, đủ liều còn phải tính toán đúng thời điểm, đúng đường đưa thuốc vào cơ thể sao cho nồng độ kháng sinh đến được vị trí nhiễm khuẩn đạt được hiệu quả. Ví dụ, nồng độ kháng sinh đạt được trong lớp dịch biểu mô tế bào và trong đại thực bào phế nang phải đủ để diệt VK ở trong tế bào và cả ở ngoài tế bào<sup>9,45,35</sup>.

Một báo cáo nghiên cứu ở Brazil 2016, điều trị VPLQTM thì việc điều trị kháng sinh không phù hợp hay liều lượng không điều chỉnh làm gia tăng gấp 4 lần tỷ lệ tử vong ( $p = 0,031$ )<sup>9</sup>. Nghiên cứu thuần tập hồi cứu đã mô tả thực trạng việc sử dụng kháng sinh trong điều trị VPLQTM ở Canada. Thời điểm, thời gian sử dụng và sử dụng kháng sinh phù hợp đã được đánh giá trên 200BN VPLQTM ở bốn đơn vị hồi sức tích cực. Cả tỷ lệ tử vong và thời gian điều trị tại hồi sức tích cực đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê ( $p= 0,015$ ) khi

so sánh nhóm VPLQTM sử dụng kháng sinh phù hợp với nhóm VPLQTM sử dụng kháng sinh không phù hợp<sup>47</sup>.

#### ***1.1.6. Ngày nằm viện và chi phí điều trị của viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy***

Một nghiên cứu của Rello và cộng sự cho thấy VPLQTM kéo dài thời gian thở máy từ 10-30 ngày, thời gian nằm tại khoa HSTC của nhóm có VPLQTM trung bình là 21 ngày so với 15 ngày ở nhóm không có VPLQTM<sup>48</sup>. Khi so sánh ghép cặp giữa BN nhóm có VPLQTM và nhóm không có VPLQTM thời gian thở máy trung bình, thời gian nằm tại khoa HSTC, thời gian nằm viện tương ứng ở nhóm VPLQTM (12,0; 20,5; và 43,0 ngày) cao hơn hẳn nhóm không có VPLQTM (8,0; 15,0 và 34,0 ngày) so với 8,0; 15,0 và 34,0 ngày ở nhóm chứng. Tương tự, nghiên cứu cũng chứng minh rằng khi có VPBV sẽ kéo dài thời gian nằm viện ở tất cả các nhóm BN: nhóm BN có bệnh lý ngoại khoa khi có VPBV thì thời gian nằm viện trung bình ở những BN có VPBV kéo dài là 30,0 ngày so với 22,3 ngày ở những BN không có VPBV; nhóm BN nội khoa cũng vậy thời gian nằm viện trung bình sẽ kéo dài hơn ở những BN có VPBV so với những BN không có VPBV (49,9 ngày so với 23,1 ngày)<sup>49</sup>.

Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy VPBV, VPLQTM làm kéo dài thời gian nằm viện, tăng chi phí điều trị. Tuy nhiên, việc đánh giá chính xác và toàn diện vấn đề chi phí điều trị còn khó khăn. Phân tích chi phí điều trị thực tế phụ thuộc rất nhiều yếu tố: tùy thuộc từng quốc gia, hệ thống chăm sóc y tế, tổ chức các BV và các khoa hồi sức cấp cứu ở mỗi nước.

#### ***1.1.7. Điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy***

Điều quan trọng trong điều trị VPBV, VPLQTM là phải nhận ra rằng không phải áp dụng một phác đồ cho tất cả các BN, cần phải có sự phân biệt và cân nhắc cho từng BN dựa trên: thời gian mắc bệnh, bệnh nền đi kèm, đặc

điểm loại VK kháng thuốc của nơi điều trị. Hiệp hội lồng ngực và hội nhiễm khuẩn Hoa kỳ (ATS/ IDSA) 2016 khuyến khích sử dụng phác đồ hướng dẫn điều trị VPBV, VPLQTM trên cơ sở hiểu rõ BN và điều kiện BV đang có. Hướng dẫn mới 2016 của ATS/IDSA khuyến cáo mỗi BV nên xây dựng hướng dẫn sử dụng kháng sinh cho riêng BV mình nhằm mục đích sử dụng kháng sinh ngăn ngừa, tránh dùng kháng sinh không cần thiết, dùng kháng sinh phổ rộng có tác dụng trên cả VK gram âm và tác dụng trên cả *S.aureus* để giảm đề kháng kháng sinh của VK, tránh điều trị leo thang<sup>18</sup>. Với một nguyên tắc quan trọng trong điều trị VPLQTM kháng sinh phải được chỉ định sớm nhất có thể (đặc biệt trong vòng một giờ đầu nếu có kèm theo sốc nhiễm khuẩn)<sup>50</sup>.

Cụ thể ATS/IDSA 2016 đưa ra những khuyến cáo với các mức độ bằng chứng như sau<sup>18</sup>:

Với những BN nghi ngờ VPBV, VPLQTM: khuyến cáo nên dùng phác đồ kháng sinh theo kinh nghiệm bao phủ được *S.aureus* và trực khuẩn Gram âm (khuyến cáo mạnh, mức độ bằng chứng thấp).

Điều trị tác nhân VK đặc hiệu:

- Với căn nguyên gây VPBV, VPLQTM là *S.aureus* kháng methicillin khuyến cáo điều trị với vancomycin hoặc linezolid hơn là sử dụng những kháng sinh khác hoặc kết hợp kháng sinh.

- Với căn nguyên gây VPBV, VPLQTM là trực khuẩn gram âm sinh ESBL khuyến cáo chọn kháng sinh theo kết quả nuôi cấy và kháng sinh đồ căn cứ trên từng BN (khuyến cáo mạnh, mức độ bằng chứng rất thấp).

Thời gian điều trị:

- Với VPBV, VPLQTM khuyến cáo sử dụng liệu trình điều trị kháng sinh 7 ngày có lợi so với liệu trình dài ngày hơn (khuyến cáo mạnh, mức độ bằng chứng trung bình). ATS/IDSA lưu ý rằng: liệu trình điều trị kháng sinh

ngắn hơn hay dài hơn phụ thuộc vào mức độ cải thiện triệu chứng lâm sàng, XQuang ngực và các xét nghiệm cận lâm sàng khác<sup>18</sup>. Thời gian điều trị có thể kéo dài đến 15- 21 ngày tùy theo loại VK gây bệnh và cơ địa BN<sup>50</sup>.

Tóm lại, điều trị VPBV, VPLQTM có cùng mục tiêu kiểm soát bằng được tình trạng nhiễm khuẩn, nhưng vẫn phải lưu ý điều trị toàn diện BN: điều trị tốt bệnh lý nền- bệnh lý đi kèm, cân bằng nước điện giải, dinh dưỡng... liên tục đánh giá khả năng bỏ máy thở để nhanh chóng đưa BN ra khỏi tình trạng nguy hiểm đe dọa tính mạng.

## **1.2. Các kỹ thuật vi sinh chẩn đoán căn nguyên gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy**

### **1.2.1. Kỹ thuật nhuộm soi trực tiếp:**

Xét nghiệm nhuộm soi trực tiếp tìm VK gây bệnh là phương pháp đơn giản nhất. Mẫu bệnh phẩm để chẩn đoán bệnh lý đường hô hấp là đờm, dịch hút trên khí quản qua đường mũi, dịch rửa phế quản phế nang BAL, dịch chọc hút xuyên khí quản, chọc hút phổi. Hiện nay, vì độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật này thấp do đó rất ít được chỉ định, nó chỉ còn sử dụng trong trường hợp soi tươi trực tiếp đờm tìm nấm hay tìm trực khuẩn lao.

### **1.2.2. Các kỹ thuật nuôi cấy vi khuẩn thông thường:**

#### **1.2.2.1. Cấy đờm trực tiếp:**

Tất cả các mẫu đờm nếu đảm bảo tiêu chuẩn và đủ tin cậy mới đem nuôi cấy. Mẫu tin cậy để cấy là mẫu có nhiều tế bào bạch cầu ( $\geq 25$ ), ít tế bào vảy ( $\leq 10$ ), tỷ lệ tế bào bạch cầu/ vảy tốt nhất là  $\geq 2.5$  (thang điểm Barlett). Mỗi mẫu bệnh phẩm phải tiến hành nuôi cấy 3 chiều trên các môi trường phân lập đủ khả năng để cấy ra được các vi khuẩn gây bệnh dù khó mọc. Hay dùng 3 môi trường: thạch máu, thạch Socola, thạch Mac Conkey.

### **1.2.2.2. Cây đờm định lượng**

Cây định lượng có thể phân biệt được tác nhân nào thật sự gây bệnh. Phương pháp này giảm tỷ lệ dương tính giả và giảm sử dụng kháng sinh không cần thiết. Thời điểm lấy mẫu, cách lấy mẫu và phương pháp đánh giá mẫu đờm tương tự như cây không định lượng.

Nguyên tắc cây định lượng là pha loãng bệnh phẩm theo một tỷ lệ nhất định, cấy trên 3 môi trường cơ bản như trên, sau đó căn cứ số lượng VK mọc trên từng môi trường để tính ra số lượng VK có trong bệnh phẩm. Theo Monroe nhiễm khuẩn đường hô hấp dưới (viêm phổi nguyên hoặc bội nhiễm phổi) thì kết quả cây định lượng phải có nồng độ  $\geq 10^6$  cfu/ml đờm<sup>49</sup>. Đối với bệnh phẩm là dịch phế quản hút qua nội soi thì theo nghiên cứu của Ramussen chỉ cần nồng độ  $\geq 10^4$  cfu/ml dịch rửa phế quản phế nang BAL khi nuôi cấy thì độ đặc hiệu 100% đối với nhiễm khuẩn đường hô hấp dưới<sup>51</sup>. Và chỉ tiến hành định danh và làm kháng sinh đồ đối với các VK có lượng  $\geq 10^3$  cfu/ml.

### **1.2.3. Các phương pháp định danh vi khuẩn**

Dựa vào kiểu khuẩn lạc, hình thái tế bào, kiểu Gram, điều kiện sống, kiểu biến dưỡng, đặc điểm sinh lý sinh hóa của VK để phân loại định danh. Định danh VK vô cùng quan trọng vì giúp các bác sỹ lựa chọn kháng sinh phù hợp, xác định được ý nghĩa của các dấu hiệu lâm sàng đặc trưng của các tác nhân gây bệnh, ngăn ngừa lây nhiễm cho BN khác cũng như cho nhân viên y tế. Có 3 phương pháp định danh VK hiện nay đang sử dụng: phương pháp thông thường (phương pháp kiểu hình), phương pháp miễn dịch (chẩn đoán huyết thanh học), phương pháp sinh học phân tử.

#### **1.2.3.1. Phương pháp định danh thông thường**

Đây là phương pháp định danh dựa trên các đặc điểm sinh hóa sinh lý của vi sinh vật. Để các thử nghiệm này được tiến hành thuận lợi hơn, các nhà sản xuất đã chế tạo ra những bộ kit chẩn đoán nhanh để định danh vi

khuẩn. Các thử nghiệm hoá sinh ở đây đã được nghiên cứu và thu nhỏ. Strip Api-20 là một ví dụ về các thử nghiệm loại này, mỗi Strip có 20 test được thực hiện bằng phương thức đơn giản giúp tiết kiệm thời gian và kinh phí mà hiện nay vẫn đang được sử dụng rộng rãi.

### ***1.2.3.2. Phương pháp sinh học phân tử định danh vi sinh vật:***

Một nguyên tắc của các xét nghiệm nói chung là cung cấp kết quả xét nghiệm càng nhanh càng tốt trong khi vẫn đảm bảo tính chính xác và chất lượng. Do đó, những tiến bộ trong công nghệ phân tích, định danh VK không chỉ nâng cao độ chính xác mà còn giảm thời gian từ khi thu thập bệnh phẩm đến khi có kết quả mong muốn.

Ứng dụng nhiều nhất trong y học hiện nay là kỹ thuật phản ứng chuỗi (Polymerase Chain Reaction- PCR) với nhiều dạng phản ứng khác nhau. Đây là một trong phản ứng bản lề trong các kỹ thuật sinh học phân tử. Ở trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ xin đề cập đến ứng dụng của PCR trong xác định căn nguyên nhiễm khuẩn và sẽ được trình bày kỹ ở phần sau.

## **1.3. Tổng quan về quantitative multiplex realtime PCR**

### ***1.3.1. Vài nét về PCR***

Phản ứng chuỗi (Polymerase Chain Reaction- PCR) là một kỹ thuật sinh học phân tử, phản ứng khuếch đại một hoặc vài bản sao của một đoạn DNA tạo ra hàng ngàn đến hàng triệu bản sao của một chuỗi DNA cụ thể. Nguyên lý cơ bản của sao chép DNA bằng hai đoạn mồi đã được Gobind Khorana mô tả vào năm 1971<sup>52</sup>. Tuy nhiên, khái niệm sử dụng hướng tiếp cận sử dụng hai cặp mồi như vậy đã không thành công trong suốt khoảng mười hai năm kế tiếp sau đó. Mãi đến mùa xuân năm 1983, Kary Mullis, người phát minh ra kỹ thuật PCR đã phát hiện ra các nguyên tắc cơ bản giúp ông có thể phát triển và triển khai kỹ thuật này tại Cetus Corporation, nơi ông làm việc và đến năm 1993 ông đã được trao giải thưởng Nobel về phát minh vĩ đại này.

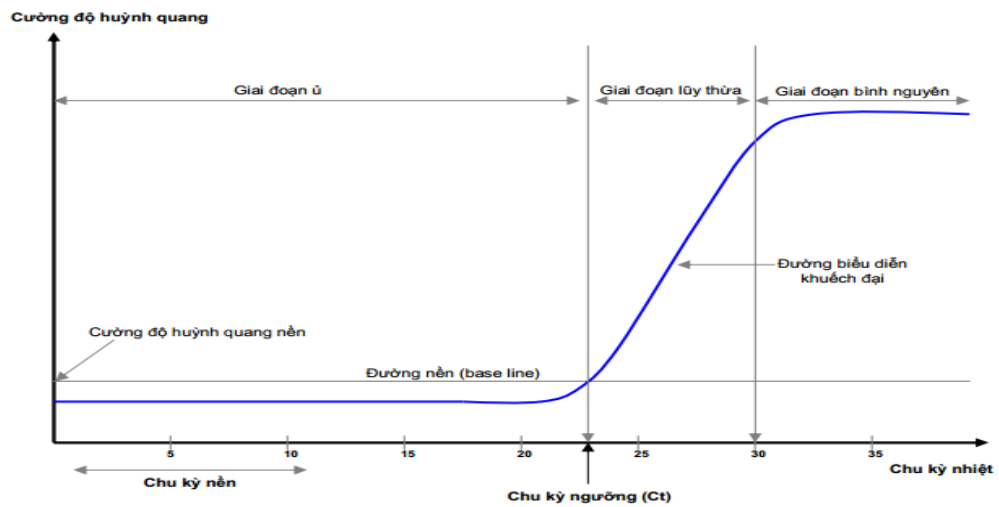
### 1.3.2. Nguyên lý kỹ thuật PCR:

Kỹ thuật này dựa trên nguyên lý tổng hợp DNA trong tế bào, trong đó DNA được nhân lên theo cơ chế bán bảo tồn. Về nguyên tắc để bắt đầu quá trình tổng hợp DNA, hai sợi DNA làm khuôn mẫu bị tách ra dưới tác dụng của nhiệt độ. Hai đoạn môi oligonucleotide từ 20-40 nucleotide sẽ gắn vào các vị trí bổ sung trên đoạn DNA mẫu. Trong điều kiện của PCR, hai môi sẽ được kéo dài về hai phía, tạo ra đoạn DNA mới bổ sung với đoạn khuôn mẫu. Quá trình khuếch đại xảy ra dưới sự xúc tác của enzym *Taq* polymerase, với một cặp môi đặc hiệu một đoạn DNA nào đó sẽ được tổng hợp sau mỗi chu kỳ của PCR<sup>52,53,54</sup>.

### 1.3.3. Realtime PCR và Classical PCR

Trong kỹ thuật PCR, sau khi hoàn tất khuếch đại đoạn DNA đích, phải làm điện di trên gel agarose để phát hiện và phân tích sản phẩm DNA có đúng kích thước hay trình tự như mong muốn không. Kỹ thuật PCR mà cần phải có giai đoạn thí nghiệm để đọc và phân tích sau khi hoàn tất khuếch đại như vậy gọi là kỹ thuật PCR cổ điển (Classical PCR)<sup>55</sup>.

Realtime PCR là kỹ thuật PCR mà kết quả khuếch đại DNA đích hiển thị được ngay sau mỗi chu kỳ nhiệt của phản ứng và kết quả cuối cùng của phản ứng khuếch đại cũng được hiển thị ngay khi hoàn tất phản ứng<sup>53,55</sup>. Chìa khóa kỹ thuật chính của hóa chất và thuốc thử có trong ống phản ứng realtime PCR đó là chất huỳnh quang được thêm vào hỗn hợp phản ứng. Đến nay, đã có nhiều chất huỳnh quang được sử dụng trong kỹ thuật realtime PCR và phổ biến nhất là sử dụng *probe* làm chỉ thị tín hiệu. *Probe* được dịch là “đoạn dò”, đó là những đoạn oligonucleotide sợi đơn có trình tự có thể bắt cặp bổ sung với một trình tự đặc hiệu trên DNA đích. Nguyên tắc *probe* sẽ bắt cặp với sản phẩm khuếch đại đặc hiệu trong ống phản ứng và sẽ có sự phát huỳnh quang từ ống phản ứng khi nó nhận được nguồn sáng kích thích<sup>53</sup>.

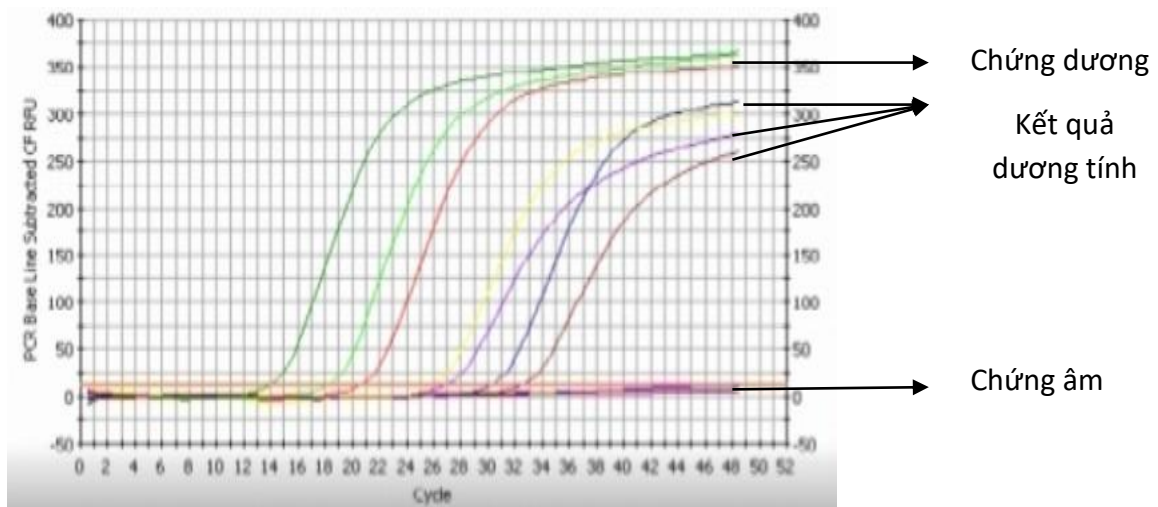


**Biểu đồ 1.1. Đường khuếch đại ghi nhận cường độ huỳnh quang phát ra từ ống phản ứng khi nhận được ánh sáng kích thích tương ứng với từng chu kỳ nhiệt<sup>53</sup>.**

Tín hiệu huỳnh quang có thể theo dõi tại bất kỳ thời điểm nào của quy trình phản ứng. Sản phẩm PCR có thể phát hiện bằng máy đo quang phổ kế. Thiết bị này cũng có thể phát hiện nhiều loại tín hiệu của các chất màu huỳnh quang khác nhau<sup>53</sup>.

*Ưu điểm của kỹ thuật realtime PCR* là dựa vào lượng huỳnh quang giải phóng ra trong phản ứng realtime PCR có thể biết được lượng sản phẩm PCR sau mỗi một chu kỳ phản ứng của quá trình khuếch đại. Độ đặc hiệu của realtime PCR cao hơn rất nhiều so với PCR cổ điển do sử dụng các mẫu dò đặc hiệu phát hiện các sản phẩm khuếch đại. Realtime PCR không cần điện di, nhuộm gel sau khi phản ứng kết thúc, do đó tiết kiệm được thời gian và hóa chất. Thời gian cho phản ứng realtime PCR chỉ mất 1- 2 giờ, trong khi PCR cổ điển phải mất 3- 5 giờ. Đặc biệt realtime PCR là hệ thống kín, ít có nguy cơ bị tạp nhiễm làm sai lệch kết quả.





**Biểu đồ 1.2. Biểu đồ kết quả multilex realtime PCR** <sup>53,55</sup>.

#### **1.3.4. Multiplex PCR (PCR đa môi):**

Đây là kỹ thuật sử dụng nhiều cặp mồi đặc hiệu cho các đoạn DNA đích đặc hiệu từ nhiều vi sinh vật muốn được phát hiện đồng thời. Để thiết kế được multiplex PCR thì quan trọng nhất là phải làm sao để thiết kế được các mồi này có cùng nhiệt độ bắt cặp lên DNA đích, đồng thời các mồi này không được bắt cặp với nhau, và quan trọng nhất là độ nhạy phát hiện tác nhân dựa trên DNA đích không bị giảm mà vẫn tương đương như độ nhạy của PCR đơn môi <sup>55</sup>. Multiplex PCR là một công cụ có giá trị để xác định vi khuẩn, vi rút và ký sinh trùng <sup>56</sup>.

#### **1.3.5. Quantitative multiplex realtime PCR (PCR đa môi định lượng)**

Với những bệnh phẩm vô khuẩn hoàn toàn như máu, dịch não tủy hoặc đối với một số loại vi khuẩn đặc biệt không cư trú tại đường thở thì việc phát hiện chúng chỉ cần sử dụng PCR định tính là có thể khẳng định là thủ phạm gây bệnh <sup>57</sup>. Mặt khác, đường hô hấp trên có cộng đồng vi sinh vật phức tạp, đặc biệt nó có thể thay đổi giữa những người hoàn toàn khỏe mạnh với nhau và giữa những người khỏe mạnh với những người bị bệnh đường hô hấp <sup>58</sup>. Chính vì vậy, để có thể khẳng định vi khuẩn gây bệnh ở đường hô hấp cần phải thực hiện kỹ thuật PCR định lượng. Có hai phương pháp: PCR định lượng tuyệt đối hoặc PCR định lượng tương đối.

Trong PCR định lượng tuyệt đối, số lượng của các DNA đích được xác định từ một đường cong tiêu chuẩn xác lập từ sự khuếch đại các DNA đích có mặt ở một loạt các nồng độ mẫu ban đầu và các giá trị Ct cho mỗi nồng độ mẫu là xác định (hay biết trước). Như vậy định lượng của DNA mẫu đích sẽ được xác định bằng cách so sánh giá trị Ct của DNA mẫu đích với đường cong tiêu chuẩn. Lý tưởng nhất là một đường cong tiêu chuẩn mới phải được xây dựng với mỗi một mẫu cần định lượng, nhưng trong thực tế, do sự phức tạp của phương pháp, nhiều các nhà nghiên cứu tạo ra một đường cong tiêu chuẩn một lần và sử dụng nó nhiều lần để định lượng mẫu trong một khoảng thời gian. Tuy nhiên, trên thực tế, có thể tính toán PCR định lượng số lượng DNA mục tiêu có trong một mẫu dựa trên các yếu tố liên quan đến việc xây dựng đường cong chuẩn bao gồm định lượng ban đầu của mẫu chuẩn, pha loãng nối tiếp của mẫu và thuật toán xác định giá trị Ct<sup>59,60</sup>.

PCR định lượng tương đối còn được gọi là phương pháp so sánh truyền thống. Phương pháp này giúp loại bỏ sự cần thiết của các đường cong chuẩn mà dựa trên phương trình toán học được sử dụng để tính toán các mức biểu thức tương đối của gen mục tiêu so với gen tham chiếu hoặc bộ gen hiệu chuẩn<sup>59,60</sup>.

#### **1.4. Tình hình nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật multiplex realtime PCR trong viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy**

##### ***1.4.1. Tình hình nghiên cứu multiplex realtime PCR ở Việt nam***

Nghiên cứu multiplex PCR ở Việt nam tăng nhiều trong những năm gần đây. Ứng dụng multiplex realtime PCR được áp dụng mạnh mẽ trong các chuyên ngành ung thư, huyết học, dịch tễ học..

Năm 2007, Nguyễn Tiến Minh và cộng sự ở Viện Công nghệ Sinh học đã phối hợp với Viện Nhi Trung Ương nghiên cứu áp dụng kỹ thuật realtime PCR để chẩn đoán nhanh cúm A/H5N1 và virus hợp bào đường hô hấp. Kết quả sử dụng phương pháp realtime PCR để chẩn đoán virus cúm A và phân type H5N1 thuộc virus cúm type A có thể rút ngắn thời gian từ 6h xuống còn

2h với độ chính xác cao. Ứng dụng kỹ thuật multiplex realtime PCR để chẩn đoán đồng thời cúm type A và phân type H5 đưa đến một giá trị thực tiễn rất lớn, giúp tiết kiệm sinh phẩm và thời gian cần thiết để chẩn đoán và điều trị<sup>61</sup>.

Năm 2012, Trần Huy Hoàng đã sử dụng phương pháp multiplex realtime PCR để xác định đặc điểm, mô hình nhiễm khuẩn bệnh viện tại BV Việt Đức. Phối hợp multiplex realtime PCR và lai plasmid để xác định một số đặc điểm sinh học phân tử của một số chủng vi khuẩn trong nhiễm khuẩn bệnh viện kháng carbapenem mang gen NDM-1<sup>62</sup>. Phan Nguyễn Thanh Vân đã sử dụng multiplex PCR để khảo sát các tổ hợp gen thường gặp trong bệnh bạch cầu cấp và kết luận cuối cùng là: đã tìm được tỷ lệ phân bố các gen thường gặp trong từng thể bệnh bạch cầu cấp dòng tủy và dòng lympho trên 341 BN nghiên cứu; nghiên cứu cũng đã thiết lập được các qui trình RT-PCR trong chẩn đoán các tổ hợp gen thường gặp trong bệnh bạch cầu cấp<sup>63</sup>.

Năm 2014, Phạm Thu Hiền đã áp dụng phương pháp multiplex realtime PCR để nghiên cứu dịch tễ học của viêm phổi không điển hình ở trẻ em. Kết quả trong 722BN viêm phổi ở lứa tuổi từ 12 đến 15 tuổi thì có 215BN phát hiện là do căn nguyên *M.pneumoniae*, *C.pneumoniae*, *L.pneumoniae*, *M.pneumoniae* chiếm tỷ lệ cao nhất là 26,3% và do vi rút chiếm 28,37%<sup>64</sup>.

Năm 2017, Phạm Hùng Vân và cộng sự nghiên cứu đa trung tâm sử dụng kỹ thuật multiplex realtime PCR để tìm tác nhân gây viêm phổi cộng đồng nặng cần nhập viện điều trị. Có tất cả 145 BN viêm phổi cộng đồng và 126 BN nhiễm trùng đợt cấp COPD được đưa vào nghiên cứu. Kết quả multiplex realtime PCR cho thấy có đến 69% các trường hợp là phát hiện được tác nhân vi sinh gây bệnh với *S. pneumoniae* và *H. influenzae* là có tỷ lệ cao nhất (41.3% và 22.2%), kể đến đó là *K. pneumoniae* (11.4%), *A. baumannii* (10.7%), *E. coli* (6.6%) và *P. aeruginosa* (6.3%), ngoài ra còn có các tác nhân khác được phát hiện với tỷ lệ thấp hơn. Nếu chỉ dựa vào phương pháp vi sinh nuôi cấy thì các vi khuẩn cộng đồng như *S. pneumoniae* và *H. influenzae* sẽ không có vai trò gì trong gây bệnh viêm phổi cộng đồng và như

vậy thì rất mâu thuẫn với các thông tin từ các tài liệu kinh điển. Chính vì vậy giải pháp realtime PCR đã thật sự đưa ra được phổ vi sinh vật thật sự gây viêm phổi cộng đồng vì kết quả không khác biệt với các nghiên cứu kinh điển. Kết luận của nghiên cứu là để có thể phát hiện được tác nhân vi sinh gây viêm phổi cộng đồng thì việc áp dụng kỹ thuật realtime PCR là thật sự cần thiết và giải pháp này hiện nay là rất khả thi về kỹ thuật và cả về kinh tế<sup>65</sup>.

Ngoài ra, cho đến nay đã có rất nhiều nghiên cứu về căn nguyên, về các biện pháp phòng ngừa và về các biện pháp điều trị VPLQTM, nhưng chưa có nghiên cứu nào áp dụng multiplex realtime PCR để chẩn đoán sớm và áp dụng kết quả vào điều trị ở Việt nam.

#### ***1.4.2. Tình hình nghiên cứu multiplex realtime PCR trong viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy trên thế giới***

Năm 2016, Clavel (Pháp) và cộng sự đã công bố một nghiên cứu được thiết kế ở những bệnh nhân nghi ngờ VPLQTM. Trong nghiên cứu, những bệnh nhân này được lấy mẫu dịch rửa phế quản phế nang (BAL) và dịch hút qua ống nội khí quản cùng đồng thời thực hiện hai phương pháp multiplex realtime PCR và nuôi cấy VK thường quy nhằm so sánh khả năng phát hiện VK của từng phương pháp trên từng mẫu bệnh phẩm. Đích phát hiện của nghiên cứu là 3 loại VK hay gặp gây bệnh VPLQTM ở Pháp là *S.aureus*, *P.aeruginosa* và *H.influenzae*. Nghiên cứu cũng có mục đích tìm kiếm một kỹ thuật cho kết quả nhanh hơn để chẩn đoán căn nguyên VK gây bệnh, giảm nguy cơ điều trị kháng sinh ban đầu không phù hợp cũng như sử dụng kháng sinh phổ rộng làm tăng nguy cơ kháng thuốc. Với cách lấy bệnh phẩm BAL và ngưỡng phát hiện  $10^4$ cfu/ml cho thấy độ nhạy của multiplex realtime PCR tương ứng cho 3 loại VK là 96,3%, 100% và 73,7%. Giá trị chẩn đoán chung của phương pháp là độ nhạy là 89,2%, độ đặc hiệu 97,1%. Với cách lấy bệnh phẩm ETA độ nhạy multiplex realtime PCR là 100% trong phát hiện *P.aeruginosa* và *H.Influenzae*, riêng với *S. aureus* là 79,2%. Giá trị chẩn đoán chung của phương pháp là độ nhạy 71,8%, độ đặc hiệu 96,6%. Kết luận của

ngiên cứu là: Thứ nhất, để chẩn đoán vi sinh VPLQTM chỉ cần lấy dịch phế quản qua nội khí quản ETA- không xâm lấn và rẻ tiền mà vẫn cho kết quả tương đương dịch rửa phế quản phế nang BAL Thứ hai, đối với bệnh phẩm đường hô hấp thì PCR định lượng tốt hơn PCR định tính vì khẳng định được VK gây bệnh và giảm được tỷ lệ dương tính giả. Thứ ba, mặc dù có tỷ lệ dương tính giả nhất định nhưng nghiên cứu vẫn cho thấy nguy cơ lạm dụng thấp hơn lợi ích điều trị kháng sinh trúng đích<sup>66</sup>.

Một nghiên cứu khác cũng ở Pháp được thực hiện từ tháng 5/2017 đến tháng 11/2018. Mục đích của nghiên cứu so sánh kết quả phát hiện VK gây VPLQTM giữa nuôi cấy thường qui và đánh giá hiệu quả việc sử dụng kháng sinh phổ hẹp để điều trị VPLQTM theo kết quả sớm của multiplex realtime PCR. Trong nghiên cứu này, multiplex realtime PCR thiết kế để phát hiện 21 loại VK và 19 gen kháng kháng sinh trên mẫu dịch rửa phế quản phế nang (BAL) hoặc bệnh phẩm hút qua catheter nội soi phế quản (PTC) ở những BN nghi ngờ VPLQTM. Nếu với ngưỡng chẩn đoán xác định nguyên nhân VK gây bệnh  $10^4$ cfu/ml (BAL) và  $10^3$ cfu/ml (PTC) theo khuyến cáo của ATS/IDSA 2016, nghiên cứu đã cho thấy kỹ thuật qPCR có độ nhạy 80% (CI 95%, 71-88%), độ đặc hiệu là 99% (CI 95%, 99-100%), giá trị dự đoán dương tính là 87% (CI 95%, 80- 93%) và giá trị dự đoán âm tính là 99% (CI 95%, 99- 99%). Tổng kết nghiên cứu cho thấy, kết quả multiplex realtime PCR dẫn đến thay đổi kháng sinh 66% BN trong đợt điều trị viêm phổi, trong đó sử dụng kháng sinh sớm và hiệu quả ở 21% BN; giảm leo thang kháng sinh ở 39% BN; tối ưu hóa sử dụng kháng sinh ở 3% BN. Đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên sử dụng multiplex realtime PCR để hướng dẫn sử dụng kháng sinh điều trị VPLQTM và nghiên cứu đã đưa ra kết luận: multiplex realtime PCR giúp cải thiện việc điều trị kháng sinh theo kinh nghiệm ở 63% BN VPLQTM<sup>67</sup>.

Thật thiếu sót nếu không nhắc đến một nghiên cứu ở Hy Lạp được công bố năm 2017. Nghiên cứu được thực hiện ở khoa hồi sức nhi với mục đích: thứ nhất, xác định VK gây bệnh VPLQTM bằng cả hai kỹ thuật nuôi cấy VK thường quy và multiplex realtime PCR; thứ hai, so sánh thời gian trả kết quả và giá trị chẩn đoán của cả hai kỹ thuật. Các nhà nghiên cứu đã sử dụng phương pháp hút đờm thông thường qua ống nội khí quản nuôi cấy định lượng thường quy và xác định là VK gây bệnh khi kết quả định lượng là  $10^5$ cfu/ml; phương pháp multiplex realtime PCR sẽ nhằm mục đích phát hiện 7 loại VK được coi là tác nhân gây bệnh chính cho VPLQTM trên toàn thế giới gồm: *Streptococcus pneumoniae*, *Methicillin-resistant Staphylococcus (MRSA)*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila*. Kết quả nghiên cứu cho thấy multiplex realtime PCR xác định VK tốt hơn so với nuôi cấy thường quy trong VPLQTM với (độ nhạy 76%, độ đặc hiệu 97%, giá trị dự đoán dương tính 90%, giá trị dự đoán âm tính 93% so với nuôi cấy tương ứng là 24%, 92%, 55%, 79%). Ngoài ra, multiplex realtime PCR còn làm tăng đáng kể khả năng chẩn đoán đối với các VK *MRSA*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* và *Mycoplasma pneumoniae*. Một ưu điểm nữa là multiplex realtime PCR còn có khả năng phát hiện nhiều VK gây bệnh, nghiên cứu đã phát hiện 2 BN: một BN có kết hợp cả *MRSA* và *Acinetobacter*; một BN có cả *Pseudomonas aeruginosa* và *Klebsiella*. Kết luận của nghiên cứu là việc sử dụng multiplex realtime PCR làm tăng độ nhạy của chẩn đoán, đặc biệt là trong các VK không dễ nuôi cấy và những trường hợp đã sử dụng kháng sinh để điều trị trước đó. Ưu điểm của multiplex realtime PCR là thời gian cho kết quả ngắn đáng kể so với nuôi cấy do đó sẽ giảm đáng kể việc kê đơn thuốc kháng sinh không phù hợp. Và mặc dù hiện tại giá thành multiplex realtime

PCR còn cao hơn so với nuôi cấy thường nhưng so với việc sử dụng kháng sinh không phù hợp, thời gian nằm điều trị kéo dài và phụ thuộc thở máy thì multiplex realtime PCR vẫn đem lại nhiều lợi thế<sup>68</sup>.

Cũng đề cập đến cần phải có một xét nghiệm cho kết quả sớm, chính xác để đẩy nhanh quá trình chẩn đoán căn nguyên vi khuẩn nhằm hạn chế sử dụng kháng sinh không phù hợp tăng nguy cơ kháng thuốc trong điều trị BN VPLQTM, một nghiên cứu tiên cứu được thực hiện từ tháng 5/ 2017 đến tháng 11/ 2018 ở Pháp. Mục đích của nghiên cứu so sánh kết quả phát hiện VK gây VPLQTM giữa phương pháp nuôi cấy thường qui và đánh giá hiệu quả việc sử dụng kháng sinh phổ hẹp để điều trị VPBV, VPLQTM theo kết quả sớm của multiplex realtime PCR. Trong nghiên cứu này, multiplex realtime PCR thiết kế để phát hiện 21 loại VK và 19 gen kháng kháng sinh trên mẫu dịch rửa phế quản phế nang (bronchoalveolar lavage- BAL) hoặc bệnh phẩm hút qua catheter nội soi phế quản (plugged telescoping catheter- PTC) ở những BN lâm sàng nghi ngờ VPBV, VPLQTM. Đặc điểm dịch tễ sơ bộ của nghiên cứu là trong 95 mẫu bệnh phẩm ở 85 BN, 72 mẫu BAL và 23 mẫu PTC có đặc điểm chung là 73% là nam giới, tuổi trung bình 64 tuổi, tỷ lệ tử vong là 32% ; tỷ lệ các thuốc kháng sinh hay được sử dụng nhất gồm: cefotaxime (12%), piperacillin/tazobactam (7%), amikacin (7%) và cefepime (6%). Kết quả vi sinh cho thấy thời gian trung bình cho kết quả của multiplex realtime PCR là 4,6 giờ; 104 mẫu phát hiện được VK bằng multiplex realtime PCR- 128 mẫu được phát hiện bằng nuôi cấy thường qui. VK được phát hiện nhiều nhất trong nghiên cứu là *Pseudomonas aeruginosa* (n= 32 và n= 33 tương ứng trên nuôi cấy và multiplex realtime PCR), *Escherichia coli* (n= 15 cả trên nuôi cấy và multiplex realtime PCR), *Klebsiella pneumoniae* (n= 14 và n= 9), và *Staphylococcus aureus* (n = 12 và 8). Nếu với ngưỡng chẩn đoán xác định nguyên nhân VK gây bệnh  $10^4$ cfu/ml (BAL) và  $10^3$ cfu/ml (PTC)

theo khuyến cáo của ATS/IDSA 2016, nghiên cứu đã cho thấy multiplex realtime PCR có độ nhạy 80% (CI 95%, 71-88%), độ đặc hiệu là 99% (CI 95%, 99-100%), giá trị dự đoán dương tính là 87% (CI 95%, 80- 93%) và giá trị dự đoán âm tính là 99% (CI 95%, 99- 99%). Độ nhạy multiplex realtime PCR giữa với các VK rất không đồng nhất, từ 100% đối với *Pseudomonas aeruginosa* (n= 32) hoặc *Proteus spp.* (n= 7) đến 0% cho *Streptococcus pneumoniae* (n= 2), 33% đối với *Morganella morganii* (n= 3), 67% đối với *Enterobacter cloacae* (n= 6), hoặc 73% đối với *Staphylococcus aureus* (n= 11). Nhìn chung, độ nhạy tốt hơn cho VK Gram âm (90%) so với đối với cầu khuẩn Gram dương (62%) ( $p = 0,005$ ). Độ nhạy của multiplex realtime PCR không khác nhau giữa các mẫu được thực hiện ở những BN đã dùng kháng sinh trong 7 ngày trước (n = 41, độ nhạy 82%) hoặc ở những BN không dùng kháng sinh trước đó (n = 54, độ nhạy 79%) ( $p = 0,88$ ). Tổng kết nghiên cứu cho thấy, kết quả multiplex realtime PCR có thể dẫn đến thay đổi kháng sinh 63/95 (66%) BN trong đợt điều trị viêm phổi, trong đó sử dụng kháng sinh sớm và hiệu quả ở 20/95 BN (21%); giảm leo thang kháng sinh ở 37 BN (39%); tối ưu hóa sử dụng kháng sinh ở 3 BN (3%). Đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên sử dụng multiplex realtime PCR để hướng dẫn sử dụng kháng sinh điều trị bệnh nhân VPBV, VPLQTM và nghiên cứu đã đưa ra kết luận: multiplex realtime PCR giúp cải thiện việc điều trị kháng sinh theo kinh nghiệm ở 63% bệnh nhân nghi ngờ VPBV, VPLQTM; so với nuôi cấy thường quy thì multiplex realtime PCR trong nghiên cứu có độ nhạy 80% (CI 95%,71-88%) và độ đặc hiệu 99% (CI 95%, 99- 100%); multiplex realtime PCR phát hiện VK gram âm tốt hơn cầu khuẩn gram dương<sup>67</sup>.



## 1.5. Chiến lược sử dụng kháng sinh điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy

### 1.5.1. Các căn cứ cơ sở lựa chọn và sử dụng kháng sinh hợp lý điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy

#### 1.5.1.1. Yếu tố nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng thuốc

**Bảng 1.2.** Tổng hợp các yếu tố nguy cơ mắc phải các vi khuẩn đa kháng

Vi khuẩn	Yếu tố nguy cơ
<i>Staphylococcus aureus</i> kháng methicillin (MRSA)	Điều trị tại nơi có > 20% <i>S.aureus</i> đa kháng <sup>5,18</sup>
	Truyền kháng sinh tĩnh mạch trong vòng 90 ngày trước đó.
	Điểm APACHE II cao hoặc có phẫu thuật trước đó <sup>69</sup> .
	VPBV muộn, có MRSA cư trú tại mũi họng <sup>69</sup> .
<i>P.aeruginosa</i> đa kháng hoặc kháng carbapenem	Điều trị tại nơi có tỷ lệ <i>P.aeruginosa</i> kháng kháng sinh > 10% <sup>18</sup> .
	Truyền kháng sinh tĩnh mạch trong vòng 90 ngày trước đó, đặc biệt là nhóm carbapenem hoặc fluoroquinolon <sup>18,70,71</sup> .
	Thời gian nằm viện dài >3 tuần, có bệnh gan mạn tính, đái tháo đường hoặc phải điều trị tại ICU <sup>72</sup> .
<i>Acinetobacter baumannii</i> đa kháng hoặc kháng carbapenem	Điều trị tại nơi có tỷ lệ <i>A.baumannii</i> đa kháng cao
	Chỉ số bệnh đồng mắc Charlson $\geq 4$ điểm.
	Thời gian nằm viện dài $\geq 14$ ngày hoặc nằm ICU $\geq 10$ ngày <sup>73</sup> .
	Điểm APACHE II cao $\geq 16$ hoặc điểm SAPS cao
	Có sử dụng kháng sinh Cefepim, piperacillin-tazobactam, carbapenem trước đó <sup>73</sup> .
<i>Enterobacteriaceae</i> species sinh ESBL hoặc kháng carbapenem	Điều trị tại nơi có tỷ lệ <i>Enterobacteriaceae</i> sinh gen NDM cao, hoặc có tiếp xúc với BN có nhiễm <i>Enterobacteriaceae</i> mang bla <sub>NDM</sub>
	Đang sử dụng các thuốc ức chế miễn dịch <sup>74</sup> .
	Phân lập được các <i>K.pneumoniae</i> hoặc <i>Enterobacter</i> kháng thuốc cư trú trong đường thở <sup>75</sup>
	Đã từng điều trị với fluoroquinolon hoặc cephalosporin phổ rộng
	Bệnh nghiêm trọng cần nằm điều trị tại ICU <sup>75</sup> .

\* *Các chữ viết tắt*: **MDR-GNB**: trực khuẩn Gram âm đa kháng thuốc. **IVD**: nhỏ giọt tĩnh mạch. **MU**: triệu đơn vị. **EI**: truyền tĩnh mạch kéo dài (nhỏ giọt tĩnh mạch trong 3 giờ). **CrCl**: tốc độ thanh thải creatinin. **MRSA**: *Staphylococcus aureus* kháng methicillin.

Ngoài các yếu tố nguy cơ mắc các VK đa kháng gây VPLQTM đã nêu ở trên, khi lựa chọn kháng sinh theo kinh nghiệm cho BN cần thận trọng căn cứ vào mức độ nghiêm trọng lâm sàng, dịch tễ học và mức độ kháng kháng sinh của VK đó tại các cơ sở đang điều trị<sup>18,41</sup>. Đối với BN có tình trạng huyết động không ổn định, tỷ lệ tử vong cao hoặc có nguy cơ nhiễm VK đa kháng, cần sử dụng một phác đồ phối hợp nhiều kháng sinh phổ rộng đã được chấp nhận trên toàn thế giới<sup>5,18,41,76,77,78</sup>. Thuốc kháng sinh điều trị *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (glycopeptide hoặc linezolid) nên được sử dụng nếu BN nhiễm căn nguyên này trong đường hô hấp, hoặc điều trị tại nơi có tỷ lệ nhiễm MRSA cao (20%) trong số các chủng *S. aureus*<sup>5,18,41</sup>.

### **1.5.1.2. Chiến lược quản lý kháng sinh**

Trong trường hợp nghi ngờ hoặc chẩn đoán xác định VPLQTM, không nên trì hoãn sử dụng kháng sinh vì sẽ làm gia tăng nguy cơ tử vong và chi phí điều trị<sup>20</sup>. Ngoài ra, sự có mặt của các VK gây bệnh đa kháng (MDR) thì sử dụng kháng sinh không phù hợp cũng sẽ làm gia tăng tỷ lệ tử vong<sup>79</sup>. Tuy nhiên, dữ liệu về chế độ kháng sinh tối ưu để điều trị VPLQTM do các VK đa kháng/ kháng rộng rãi/ toàn kháng (MDR / XDR / PDR) rất hạn chế. Vì lý do này, không có sự đồng thuận về sự lựa chọn kháng sinh của chiến lược điều trị, thường dựa trên kinh nghiệm của bác sĩ lâm sàng<sup>80</sup>.

Mức độ nặng của BN nghi ngờ VPLQTM làm cho các bác sĩ lâm sàng có xu hướng điều trị bắt đầu kháng sinh xuống thang ngay, phổ rộng càng sớm càng tốt. Tuy nhiên, thực tế là nhiều BN được điều trị tích cực mà không có VPLQTM. Chính vì vậy, điểm viêm phổi (CPIS), hoặc các dấu ấn sinh học

không đặc hiệu như procalcitonin (PCT) và protein phản ứng C (CRP) phải được áp dụng để bắt đầu sử dụng hoặc ngừng kháng sinh điều trị<sup>81</sup>. Thời gian điều trị tối ưu, bao gồm cả phác đồ kháng sinh kết hợp được khuyến cáo ở rất nhiều tài liệu. Hai điểm khác biệt đáng chú ý đã được quan sát thấy giữa các hướng dẫn VPBV, VPLQTM được khuyến nghị bởi IDSA/ ATS năm 2016 và Châu Âu/ Mỹ Latinh vào năm 2017<sup>82</sup>, cũng như Hướng dẫn của Hội hô hấp Châu Âu khuyến cáo dùng kháng sinh điều trị VPBV không quá 7 ngày<sup>5</sup>. *Thứ nhất*, để giảm bớt gánh nặng kháng thuốc, hướng dẫn IDSA/ ATS coi liệu pháp kháng sinh <7 ngày là thời gian thuận lợi nhất, nhưng phải phụ thuộc vào phản ứng lâm sàng và sự cải thiện các thông số Xquang và xét nghiệm của BN. Còn các hướng dẫn của Châu Âu ủng hộ các đợt kháng sinh dài > 7 ngày ở những BN bị suy giảm miễn dịch, thay đổi cấu trúc phổi, viêm phổi hoại tử, phù thũng, điều trị kháng sinh ban đầu không phù hợp, nhiễm khuẩn huyết do trực khuẩn Gram âm kháng thuốc rộng rãi<sup>82</sup>. *Thứ hai*, cần kê đơn “carbapenem kép” với trực khuẩn Gram âm đa kháng, kháng rộng rãi (phức hợp *A.baumannii* kháng thuốc rộng rãi và *P.aeruginosa* kháng carbapenem) cho BN sốc nhiễm khuẩn nặng và thời gian điều trị nên kéo dài > 7 ngày cho BN VPLQTM, cho BN đang sử dụng thuốc ức chế miễn dịch (bị giảm bạch cầu trung tính hoặc là người nhận tế bào gốc cấy ghép), BN có tình trạng huyết động không ổn định dai dẳng, BN đã nhận được liệu pháp kháng sinh không phù hợp ngay ban đầu hoặc BN phải sử dụng kháng sinh phổ rộng (ví dụ: tigecycline, colistin, v.v.)<sup>83</sup>.

Thời gian điều trị kháng sinh quá ngắn thì không đảm bảo đủ kiểm soát nhiễm khuẩn có thể tăng nguy cơ tử vong nhưng nếu kéo dài quá sẽ dẫn đến tăng nguy cơ kháng thuốc của VK. Và có thể thấy, thời gian sử dụng kháng sinh điều trị VK đa kháng đang còn tranh cãi, không có khuyến cáo rõ ràng. Làm thế nào để điều trị VPLQTM ổn định và không tăng tỷ lệ tử vong hoặc tái phát ở những BN

nhiễm VK đa kháng với thời gian phù hợp. Chiến lược này có thể dẫn đến giảm phơi nhiễm BN với kháng sinh trong thời gian nằm viện ở khoa hồi sức và giảm kháng thuốc cũng như lan truyền của VK đa kháng.

### **1.5.1.3. Dữ liệu PK/PD của thuốc**

Theo hướng dẫn của IDSA/ATS VPBV, VPLQTM năm 2016<sup>18</sup>, dữ liệu PK và PD rất quan trọng cần nhắc khi kê đơn thuốc kháng sinh trong điều trị trực khuẩn Gram âm đường hô hấp đa kháng (MDR) hoặc kháng rộng rãi (XDR). Một số dữ liệu về PK/PD của một số kháng sinh quan trọng được đưa ra. Mặc dù có tính chất kìm khuẩn và nồng độ huyết thanh tương đối thấp ở liều tiêu chuẩn (tải 100 mg, sau đó là 50 mg mỗi 12 giờ), *tigecycline* có hoạt tính in vitro chống lại hầu hết CRE và một số CR-A. các phân lập phức hợp *baumannii*, và do đó thường được sử dụng phối hợp (kết hợp với meropenem và colistin) trong điều trị vi khuẩn có sinh KPC. Lưu ý, điều trị bằng *tigecycline* với liều tải 200 mg sau đó 100 mg mỗi 12 giờ cho thấy tỷ lệ chữa khỏi bệnh tốt hơn về mặt số học so với imipenem/ cilastatin (1 g mỗi 8 giờ) trong số các bệnh nhân bị VPBV. Tỷ lệ diện tích dưới đường cong nồng độ – thời gian trong 24 giờ (AUC<sub>0–24</sub>) chia cho nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) (AUC<sub>0–24</sub>/ MIC) cao hơn trong nhóm được điều trị bằng chế độ liều tiêu chuẩn, và khả năng thâm vào nhu mô phổi bị nhiễm trùng cao hơn đáng kể<sup>84</sup>. Mặc dù, PK tốt hơn với *tigecycline* liều cao, khoảng 23,5% bệnh nhân được dùng *tigecycline* 7 ngày đơn trị liệu đã cho thấy có bội nhiễm với *P.aeruginosa*. Do đó, trong VPLQTM muộn nên kết hợp một kháng sinh chống *P.aeruginosa* với *tigecycline*.

*Polymyxin B* và *colistin* (polymyxin E): Liều lượng tối ưu của tiêm truyền tĩnh mạch colistin đã được đề xuất để tối đa hóa nồng độ chống lại các bệnh nhiễm trùng liên quan đến trực khuẩn Gram âm kháng rộng rãi (với colistin MIC 1 mg/ L). Ngoài ra, khi colistimethat sodium được khí dung liều

lượng 2 triệu đơn vị, AUC ở phổi cao của colistin (dao động 18,9–73,1 µg h/ml) và nồng độ colistin tối đa ở phổi cao (6,00–3,45 µg/ml) đạt được ở người<sup>85</sup>. Mỗi 1 MUI colistimethat sodium khí dung được sử dụng qua máy khí dung áp lực hoặc máy khí dung siêu âm cứ sau 8 giờ kết hợp với liệu pháp colistin truyền tĩnh mạch cho thấy cải thiện tỷ lệ chữa khỏi lâm sàng của VPLQTM gây ra bởi trực khuẩn Gram âm nhạy cảm với colistin. Ngược lại,<sup>86,87</sup> phác đồ liều cao colistimethat sodium khí dung (4 MUI mỗi 8 giờ) đơn trị liệu cũng cải thiện chức năng oxy hóa phổi, và giảm thời gian thở máy, cũng như loại trừ GNB sớm hơn, trong khi không có tăng độc tính trên thận so với colistin truyền tĩnh mạch liều cao tương ứng (4,5 MUI mỗi 12 giờ sau liều nạp 9 MUI) trong điều trị VPLQTM<sup>85,86,87</sup>.

#### **1.5.1.4. Các kháng sinh và phương pháp điều trị VPLQTM mới**

Ceftazidime-avibactam, có phổ vượt trội hơn tất cả các carbapenem, đã được FDA Hoa Kỳ và EMA chấp thuận để điều trị VPBV, VPLQTM do CRE (sinh gen KPC, ESBL, AmpC- lactamase và/ hoặc oxacillinase [OXA]-48...) và *P.aeruginosa* kháng carbapenem, *Enterobacteriaceae spp* sinh metallo-lactamase, *A.baumannii spp.* kháng thuốc rộng rãi<sup>88,89,90</sup>. Sự kết hợp của các kháng sinh khác (ví dụ: plazomicin, fosfomicin)<sup>91</sup> hoặc các kháng sinh chống MRSA với ceftazidime-avibactam được khuyến cáo mạnh để kiểm soát các vi khuẩn gây VPLQTM kháng thuốc.

Ceftolozane/tazobactam (C/T) là kháng sinh kết hợp giữa cephalosporin và chất ức chế beta-lactamase có hoạt tính diệt khuẩn cao chống lại một số chủng *P.aeruginosa* đa kháng. Tazobactam tăng diệt khuẩn trên *Enterobacteriaceae* sinh ESBL<sup>92</sup>. Tháng 6/2019, thuốc đã được FDA Hoa Kỳ chấp thuận cho liệu pháp điều trị VPBV, VPLQTM.

Cefiderocol là một cephalosporin đường tiêm có cơ chế tác động trên hệ thống vận chuyển sắt của vi khuẩn để tăng nhạy cảm của vi khuẩn với kháng

sinh. Cefiderocol trong phòng thí nghiệm có hoạt tính chống lại CRE, *P.aeruginosa* và *A.baumannii*. Nghiên cứu lâm sàng giai đoạn 3 việc sử dụng nó để điều trị VPBV, VPLQTM hiện đang được tiến hành.

Plazomicin là một aminoglycoside mới đặc trưng bởi một phổ kháng khuẩn rộng chủ yếu là họ *Enterobacteriaceae* kháng thuốc rộng rãi, xâm nhập phổi tốt, và độc tính thấp. Thuốc đang thử nghiệm lâm sàng giai đoạn III để so sánh hiệu quả và an toàn của plazomicin với colistin khi kết hợp với một loại kháng sinh thứ hai (meropenem hoặc tigecycline) cho điều trị VPLQTM do CRE.

Sự kết hợp của imipenem/cilastatin và relebactam ức chế mạnh mẽ cả hai  $\beta$ -lactamase nhóm A và C, nhưng không hoạt động chống lại metallo-beta-lactamase (MBLs) và lớp D carbapenemases. Relebactam phục hồi hoạt động chống lại imipenem- kháng *P.aeruginosa* và *Enterobacteriaceae*, nhưng không có tác dụng đối với *A.baumannii*<sup>93</sup>.

Với những BN VPBV, VPLQTM nghi ngờ do nhiễm *MRSA* ngoài những kháng sinh đang sử dụng hiện có, một loại thuốc mới hơn đã được phê duyệt là telavancin. Telavancin, được FDA chấp thuận vào năm 2013, là một loại thuốc thay thế để điều trị VPLQTM có liên quan đến *MRSA*. Tỷ lệ khỏi bệnh VPLQTM do *MRSA* sau khi điều trị bằng telavancin là 82%, trong khi tỷ lệ chữa khỏi bằng vancomycin là 74%<sup>94</sup>. Telavancin đã được chứng minh là hiệu quả hơn vancomycin trong điều trị viêm phổi liên quan đến MSSA vì nó có hoạt tính chống lại một số VK gram dương ngoài *MRSA*<sup>95</sup>. Tuy nhiên, telavancin ở BN suy thận nặng có thể làm tăng tỷ lệ tử vong so với vancomycin<sup>96</sup>. Ngoài ra, daptomycin, ceftobiprole đã được phê duyệt để điều trị nhiễm trùng *MRSA*, nhưng không được khuyến cáo để điều trị VPLQTM<sup>1,97,98</sup>.

Cuối cùng, quan điểm trị liệu hứa hẹn nhất có lẽ là việc sử dụng các phương pháp điều trị hỗ trợ để trung hòa các độc tố của vi khuẩn. Xác định mục tiêu vi

khuẩn để phát triển các kháng thể đơn dòng cụ thể có thể mở đường cho việc quản lý và điều trị VPLQTM do các VK đa kháng thuốc<sup>99,100</sup>.

#### **1.5.1.5. Một số chiến lược kháng sinh điều trị cụ thể cho các vi khuẩn gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy**

##### **1.5.1.5.1. Viêm phổi do *Acinetobacter baumannii***

Phác đồ điều trị *Acinetobacte baumannii* kết hợp kháng sinh theo kinh nghiệm được khuyến cáo phổ rộng khi tỷ lệ kháng carbapenem địa phương cao. Colistin tiêm tĩnh mạch là lựa chọn cuối cùng cho cả hai: theo kinh nghiệm cũng như điều trị cho viêm phổi do *Acinetobacte baumannii* đa kháng, mặc dù phải sử dụng một liều nạp cao<sup>101</sup>, và khả năng xâm nhập vào phổi kém<sup>102</sup>. Để tăng nhạy cảm và giảm đề kháng, cần phối hợp các nhóm kháng sinh khác với colistin. Colistin kết hợp với ampicillin/ sulbactam có thể là lựa chọn điều trị tối ưu cho nhiễm *Acinetobacte baumannii* đa kháng, vì có cải thiện về mặt lâm sàng và an toàn hơn so với colistin đơn trị liệu<sup>103,104</sup>; Colistin kết hợp rifampicin cho thấy có tác dụng hiệp đồng, có cải thiện triệu chứng lâm sàng và khả năng diệt trừ VK nhưng không cải thiện tỷ lệ tử vong<sup>105,106</sup>. Trong trường hợp *Acinetobacte baumannii* toàn kháng (kể cả chủng kháng colistin), kết hợp ba loại liều cao Ampicillin/ Sulbactam (8g/4g truyền tĩnh mạch kéo dài trên 4giờ/8giờ) với liều cao meropenem (2g truyền tĩnh mạch/8giờ kéo dài hoặc liên tục) cộng với colistin, tỏ ra hiệu quả cao trong một nghiên cứu tại Hoa kỳ<sup>107</sup>.

##### **1.5.1.5.2. Viêm phổi do *Pseudomonas aeruginosa***

VPLQTM có nguy cơ do *Pseudomonas aeruginosa* nên được điều trị kết hợp với hai kháng sinh chống *Pseudomonas aeruginosa*,  $\beta$ -lactam chống *Pseudomonas* (piperacillin/ tazobactam, ceftazidime, cefepime hoặc carbapenem) cộng với aminoglycoside hoặc fluoroquinolone<sup>108</sup>. Aminoglycoside (amikacin là kháng sinh mạnh nhất trong nhóm) có thể được

chỉ định dựa trên kết quả kháng sinh đồ, tuy nhiên nhóm này có nhược điểm thâm nhập vào mô phổi viêm kém và có nhiều độc tính<sup>109</sup>. Đối với BN không bị sốc nhiễm khuẩn có thể dùng đơn trị liệu<sup>18</sup>. Trong trường hợp *Pseudomonas aeruginosa* sinh ESBL thì carbapenem là lựa chọn đầu tiên. Loại trừ ertapenem, tất cả carbapenem đều có phổ hoạt động trên *Pseudomonas aeruginosa*<sup>110</sup>. Riêng doripenem không được khuyến cáo sử dụng trong điều trị VPLQTM<sup>111</sup>.

Những BN nhiễm *Pseudomonas aeruginosa* có sốc nhiễm khuẩn, điều trị nên duy trì kết hợp hai kháng sinh còn nhạy cảm với *P.aeruginosa*. Truyền tĩnh mạch duy trì colistin vì 95% *Pseudomonas aeruginosa* được biết còn nhạy cảm với kháng sinh này<sup>112</sup>. Tránh phối hợp colistin và aminoglycosid vì tăng độc tính trên thận. Colistin phối hợp với meropenem (2g truyền tĩnh mạch mỗi 8h kéo dài hoặc liên tục) có thể coi là phác đồ cứu cánh đối với chủng *Pseudomonas aeruginosa* kháng carbapenem (MIC >8mg/l).

#### 1.5.1.5.3. Viêm phổi do Enterobacteriaceae

Trong số Enterobacteriaceae, Enterobacteriaceae sinh ESBL (ESBL-PE) và *Klebsiella pneumoniae* sinh carbapenemase (KPC) đề kháng carbapenem là căn nguyên phổ biến nhất gây VPLQTM.

Trong trường hợp BN có sốc nhiễm khuẩn và ở trong vùng lưu hành ESBL- PE, thì kháng sinh kinh nghiệm được khuyến cáo nên dùng carbapenem vì nguy cơ nhiễm ESBL- PE cao (ước tính khoảng 40%)<sup>113</sup>. Tigecycline (khi MIC là 1mg/l) và ceftazidime/avibactam (C/A) có hoạt tính chống ESBL-PE; Tuy nhiên, tigecycline được FDA cảnh báo có nguy cơ phát triển sự kháng thuốc của VK<sup>114</sup>, thuốc này chỉ nên dùng khi Enterobacteriaceae được chứng minh là có sản sinh carbapenemase<sup>90</sup>.

Phần lớn Enterobacteriaceae kháng carbapenem (CRE) kháng lại hầu hết các loại kháng sinh trên lâm sàng, bao gồm beta-lactam và aminoglycosid.



Giảm tính nhạy cảm với colistin đã được mô tả, với tỷ lệ kháng lên đến 36% ở một số khu vực của Châu Âu [88]. Trong số các CRE *Klebsiella pneumoniae* là phổ biến nhất sản xuất carbapenemase (KPC-Kp) gây VPLQTM. Các phác đồ điều trị cho VPLQTM do KPC-Kp được giới hạn bởi một số thuốc colistin, tigecycline, aminoglycoside luôn được phối hợp với một carbapenem. Các phác đồ phối hợp đều chỉ có bằng chứng yếu nên khó khăn cho việc lựa chọn phác đồ tối ưu <sup>115</sup>. Các nghiên cứu cho thấy hiện tại việc sử dụng các carbapenem được kết hợp với colistin và/hoặc tigecycline để điều trị bệnh nhân nghi ngờ VPLQTM do nhiễm KPC vẫn được khuyến cáo <sup>116</sup>. Một phác đồ carbapenem kép (ertapenem cộng với meropenem hoặc doripenem) có thể một liệu pháp thay thế điều trị VPLQTM, do các chủng KPC-Kp kháng colistin và/ hoặc với MIC cực kỳ cao của meropenem (> 64 mg/ l). Cơ chế có thể là do ái lực cao hơn của KPC đối với ertapenem, cho phép nó hoạt động như một chất ức chế tiêu hủy tế bào và tăng cường hoạt động của đồng thời carbapenem <sup>115, 117</sup>.

#### 1.5.1.5.4. Viêm phổi do *Staphylococcus aureus* kháng methicillin (MRSA)

Trong trường hợp nghi ngờ VPLQTM do MRSA, nên dùng kháng sinh theo kinh nghiệm gồm linezolid hoặc vancomycin. Nếu bệnh nhân đang điều trị ở đơn vị MRSA phổ biến thì một phác đồ kháng sinh đặc biệt nên bao gồm linezolid hoặc vancomycin <sup>18</sup>. Linezolid là một loại kháng sinh hiệu quả chống lại *S.aureus*, sự xâm nhập qua phổi của linezolid là rất tốt. Linezolid là một thay thế hiệu quả cho vancomycin ở những người bị suy thận hoặc có khả năng tiếp cận tĩnh mạch kém. Điều trị bằng linezolid bị hạn chế tối đa là 28 ngày. Sử dụng linezolid lâu hơn có thể gây ra các tác dụng phụ như giảm bạch cầu, gây mù do nhiễm axit lactic và bệnh thần kinh ngoại vi. Linezolid cũng được phát hiện có liên quan đến giảm tiểu cầu và suy tủy <sup>97</sup>. Vancomycin đã là thuốc “tiêu chuẩn” để điều trị nhiễm trùng MRSA <sup>97</sup>. Vancomycin có tỷ lệ

đề kháng thấp nhưng tác dụng diệt khuẩn chậm, khả năng xâm nhập vào phổi kém và nguy cơ suy thận cao. BN bị nhiễm các chủng *MRSA* có MIC vancomycin  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  có nguy cơ thất bại điều trị cao. Dược động học của vancomycin khác nhau, phụ thuộc vào tuổi, cân nặng và bệnh lý có từ trước. Liều vancomycin được xác định ở từng bệnh nhân VPLQTM<sup>97</sup>.

### ***1.5.2. Một số phác đồ kháng sinh cụ thể điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy***

Để xây dựng một phác đồ điều trị chi tiết và chung cho tất cả các BN VPBV, VPLQTM thật là khó khăn, lý do đầu tiên phải kể đến là đã xuất hiện quá nhiều chủng VK mới kháng thuốc, các chủng VK cũ lại xuất hiện các cơ chế kháng thuốc mới như mang các gen đột biến mới kháng nhóm kháng sinh có thể nói là “vũ khí cuối cùng” trong điều trị như nhóm carbapenem, colistin. Mặt khác, sự lựa chọn kháng sinh cũng bị thu hẹp lại do kho kháng sinh dự trữ đang cạn kiệt; việc nghiên cứu và phát hiện các kháng sinh mới cần phải có thời gian và quy trình cần thiết để có thể áp dụng điều trị trên người. Một nguyên tắc quan trọng sử dụng kháng sinh để điều trị (đặc biệt trong nhiễm khuẩn huyết, VPBV, VPLQTM) là phù hợp và sớm. Tiếp theo là đánh giá nguy cơ nhiễm VK đa kháng và tuân thủ các giả thuyết đã đề cập ở trên: sốc nhiễm khuẩn, dịch tể đơn vị đang điều trị có tỷ lệ VK đa kháng cao, có sử dụng kháng sinh trước đó, thời gian nằm viện hoặc thở máy  $> 5$  ngày, BN đã từng được tìm thấy vi khuẩn cư trú ở đường hô hấp là VK đa kháng.

Cristina Sarda và nhóm nghiên cứu (2019) đã tổng kết và đưa ra phác đồ cụ thể cho VPLQTM từ kinh nghiệm đến lúc định danh được VK gây bệnh. Chính vì vậy có thể áp dụng kết quả multiplex realtime PCR định danh VK kết hợp lâm sàng để áp dụng phác đồ này<sup>80</sup> (bảng 1.3. Khuyến cáo điều trị VPLQTM do các trực khuẩn Gram âm - xin xem phần phụ lục). Laurent Papazian và cộng sự năm 2020<sup>118</sup> đã đưa ra một bảng gợi ý lựa chọn kháng

sinh riêng biệt cho mỗi BN VPLQTM kết nối từ các hướng dẫn<sup>5,18,119</sup> ở Mỹ và các nước Châu Âu (bảng 1.4. Gợi ý kháng sinh điều trị theo kinh nghiệm điều trị VPLQTM - xin xem phần phụ lục).

Các nhà nghiên cứu ở trường đại học y Đài loan sau khi biết vi khuẩn gây bệnh thường gặp ở châu Á đa phần là các trực khuẩn Gram âm đa kháng thuốc, cũng đã nhận định một số nguyên nhân không đáp ứng với liệu pháp kháng sinh ban đầu với VPBV, VPLQTM gồm: phổ kháng sinh không phủ hết các chủng VK gây bệnh, kháng sinh không đủ liều, cần tìm kiếm thêm các nguồn nhiễm khuẩn khác (máu, nước tiểu...). Ngoài ra, các nguyên nhân thất bại trong điều trị VPLQTM còn do mức độ nặng của suy đa tạng (điểm APACHE II cao), BN có tình trạng suy giảm miễn dịch, thời gian điều trị kháng sinh không đủ, phân biệt VPBV, VPLQTM với các bệnh lý nội khác (phù phổi, suy tim sung huyết, tắc mạch phổi)<sup>69</sup> (bảng 1.5. Các phác đồ và liều lượng kháng sinh được khuyến cáo (với độ thanh thải creatinin > 50ml/phút) điều trị VPBV, VPLQTM liên quan đến trực khuẩn *A.baumannii* và *Enterobacteriaceae* kháng thuốc- xin xem phần phụ lục). Để bổ sung lựa chọn kháng sinh cho các VK khác, các nhà khoa học cũng đưa ra phác đồ điều trị VPBV, VPLQTM căn nguyên nghi do *P.aeruginosa* và/ hoặc do *S.aureus* kháng methicillin<sup>69</sup> (bảng 1.6. Các phác đồ và liều lượng kháng sinh được khuyến cáo (với độ thanh thải creatinin > 50ml/ phút) điều trị VPBV, VPLQTM do *P.aeruginosa* và/ hoặc do *S.aureus* kháng methicillin - xin xem phần phụ lục).

Zaragoza cùng các nhà khoa học ở Tây Ban Nha năm 2020 đã đưa ra bản cập nhật điều trị VPBV, VPLQTM mới. Trong bản cập nhật này, đáng chú ý nhất là sơ đồ tiếp cận và lựa chọn kháng sinh theo kinh nghiệm đối với từng VK gây bệnh. Tuy nhiên, phác đồ có đưa ra nhiều kháng sinh mới, hiện chưa được lưu hành ở Việt nam cũng như cảnh báo cần tuân thủ chặt chẽ điều kiện chỉ định đối với các kháng sinh này với mục đích hạn chế xuất hiện kháng thuốc mới và tiết

kiệm kháng sinh<sup>120,121,122</sup>(sơ đồ 1.1. Cập nhật điều trị kháng sinh VPBV, VPLQTM theo kinh nghiệm- xin xem phần phụ lục).

Năm 2017, hội Hồi sức cấp cứu và chống độc Việt nam phối hợp với hội Hô hấp Việt nam đã đưa ra phác đồ điều trị kháng sinh ban đầu theo kinh nghiệm cũng như thời gian sử dụng kháng sinh, điều chỉnh phác đồ khi có kết quả nuôi cấy VK và kháng sinh đồ cho VPBV, VPLQTM đã và đang được áp dụng trên toàn quốc<sup>50</sup> (bảng 1.7; bảng 1.8- xin xem phần phụ lục).

Tóm lại, định hướng sử dụng kháng sinh trong điều trị VPBV, VPLQTM quan trọng nhất là xác định được yếu tố nguy cơ nhiễm VK đa kháng. Điều quan trọng thứ hai trong chiến lược sử dụng kháng sinh điều trị VPBV, VPLQTM là việc sử dụng kháng sinh phải sớm và phù hợp. Những điểm này là mấu chốt cho việc điều trị thành công VPBV, VPLQTM.

## CHƯƠNG 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

##### 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

###### 2.1.1.1. Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân

- Bệnh nhân  $\geq 18$  tuổi.
- BN được nhập viện và/hoặc đặt ống nội khí quản hoặc có mở khí quản thở máy trên 48 giờ (tính cả thời gian nhập viện và/hoặc được đặt ống nội khí quản, mở khí quản và thở máy ở các bệnh viện khác).
- BN được chẩn đoán lâm sàng nghi ngờ VPBV, VPLQTM theo tiêu chuẩn của Trung tâm kiểm soát dịch bệnh Hoa kỳ CDC năm 2018 <sup>36</sup>, có thể có tiêu chuẩn vi sinh trước đó hoặc không.
- BN hoặc gia đình đồng ý tự nguyện tham gia nghiên cứu.

###### 2.1.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- BN tử vong trong vòng 48 giờ sau nhập viện hoặc sau khi đặt NKQ thở máy.
- BN hoặc gia đình không đồng ý tự nguyện tham gia nghiên cứu.

###### 2.1.1.3. Tiêu chuẩn chẩn đoán

###### 2.1.1.3.1. Tiêu chuẩn chẩn đoán viêm phổi bệnh viện

Bệnh nhân được chẩn đoán VPBV sau khi nhập viện 48 giờ và xuất hiện các dấu hiệu lâm sàng và xét nghiệm sau <sup>36</sup>:

- ✓ Có ít nhất **một** trong các tiêu chuẩn lâm sàng sau:
  - Nhiệt độ cơ thể  $> 38^{\circ}\text{C}$ .
  - Tăng bạch cầu  $> 12.000/\text{mm}^3$  hoặc giảm bạch cầu  $< 4000/\text{mm}^3$  hoặc bạch cầu đa nhân trung tính chiếm  $\geq 50\%$ .
  - Rối loạn ý thức không biết nguyên nhân ở BN  $\geq 70$  tuổi.

- Ho, khó thở tăng lên.
- Xuất hiện đờm mủ, thay đổi tính chất đờm, tăng số lượng đờm hoặc tần suất hút đờm.
- Nghe phổi có ran.
- Khí máu có giảm oxy máu, tăng nhu cầu oxy hoặc cần thở máy.
- ✓ Tổn thương trên phim XQ phổi: có ít nhất **một** tiêu chuẩn sau:
  - Xuất hiện thâm nhiễm mới hoặc thâm nhiễm cũ tiến triển.
  - Hình mờ kiểu đông đặc.
  - Hình bóng, hang mới.
- ✓ Triệu chứng vi sinh: có ít nhất **một** trong các tiêu chí dưới đây:
  - Xác định được vi khuẩn từ máu.
  - Xác định được vi khuẩn từ màng phổi.
  - Cây định lượng hoặc cấy bán định lượng dương tính từ mẫu đờm, dịch rửa phế quản phế nang BAL, mẫu dịch phế quản từ kỹ thuật chổi quét có bảo vệ PSB hoặc dịch hút phế quản thông thường.
  - Cây định lượng hoặc bán định lượng nhu mô phổi dương tính.

#### 2.1.1.3.2. Tiêu chuẩn chẩn đoán viêm phổi liên quan thở máy

Nhóm tiêu chuẩn chẩn đoán viêm phổi liên quan thở máy ở bệnh nhân hệ miễn dịch bình thường

\* Lâm sàng:

Có ít nhất **một** triệu chứng sau <sup>36</sup>:

- ✓ Sốt (> 38°C) không có nguyên nhân khác.
- ✓ Giảm bạch cầu (< 4000/mm<sup>3</sup>) hoặc tăng bạch cầu (≥ 12000/mm<sup>3</sup>)
- ✓ Suy giảm tình trạng ý thức ở người ≥ 70 tuổi mà không tìm được bất cứ nguyên nhân nào khác.

Và có ít nhất **hai** triệu chứng sau:

- ✓ Xuất hiện đờm mủ mới hoặc thay đổi tính chất đờm (màu sắc, mùi và tăng số lượng đờm hoặc tăng số lần phải hút đờm).
- ✓ Xuất hiện ho khởi phát mới hoặc ho nặng hơn, khó thở, hoặc thở nhanh.
- ✓ Nghe thấy ran ở phổi hoặc ran phế quản.
- ✓ Tình trạng trao đổi khí xấu đi (Độ bão hòa oxy giảm;  $PaO_2/FiO_2 \leq 240$ ), tăng nhu cầu oxy hoặc tăng phụ thuộc máy thở.

\* *Hình ảnh X-quang ngực:*

Có từ 2 hoặc nhiều hơn phim X-quang ngực nối tiếp nhau, hoặc chỉ cần một phim nếu BN không có tiền sử các bệnh nền ở phổi hoặc tim (như hội chứng suy hô hấp, loạn sản phế quản phổi, phù phổi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính) với ít nhất **một** trong các tiêu chuẩn sau:

- ✓ Thâm nhiễm mới.
- ✓ Tổn thương đồng đặc.
- ✓ Tổn thương hang.

Các tổn thương này tiến triển và dai dẳng.

Ngoài ra, có một số hình ảnh XQuang ngực như: “cây phế quản chứa khí”, “đám mờ tập trung”, “ vùng tăng mật độ” có thể cũng được chẩn đoán viêm phổi (kết hợp lâm sàng phù hợp).

\* Triệu chứng vi sinh: Giống tiêu chuẩn chẩn đoán VPBV (mục **2.1.1.3.1**)

*Nhóm tiêu chuẩn chẩn đoán viêm phổi liên quan thở máy ở bệnh nhân suy giảm miễn dịch*

\* *Lâm sàng:*

Có ít nhất **một** triệu chứng sau <sup>36</sup>:

- ✓ Sốt ( $> 38^\circ\text{C}$ ) không có nguyên nhân khác.
- ✓ Giảm bạch cầu ( $< 4000/\text{mm}^3$ ) hoặc tăng bạch cầu ( $\geq 12000/\text{mm}^3$ )

- ✓ Suy giảm tình trạng ý thức ở người  $\geq 70$  tuổi mà không tìm được bất cứ nguyên nhân nào khác.

Và có ít nhất **một** triệu chứng sau:

- ✓ Xuất hiện đờm mủ mới hoặc thay đổi tính chất đờm (màu sắc, mùi và tăng số lượng đờm hoặc tăng số lần phải hút đờm).
- ✓ Xuất hiện ho khởi phát mới hoặc ho nặng hơn, khó thở, hoặc thở nhanh.
- ✓ Nghe thấy ran ở phổi hoặc ran phế quản.
- ✓ Tình trạng trao đổi khí xấu đi (Độ bão hòa oxy giảm ;  $PaO_2/FiO_2 \leq 240$ ); tăng nhu cầu oxy hoặc tăng phụ thuộc máy thở.
- ✓ Có hội chứng xuất huyết.
- ✓ Đau ngực kiểu viêm màng phổi.

\* *Hình ảnh X-quang:*

Có từ 2 phim X-quang ngực nối tiếp nhau trở lên, hoặc chỉ cần một phim nếu bệnh nhân không có các bệnh nền ở phổi hoặc tim (như suy hô hấp, loạn sản phế quản phổi, phù phổi, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính) với ít nhất **một** trong các tiêu chuẩn sau:

- ✓ Thâm nhiễm mới.
- ✓ Tổn thương đồng đặc.
- ✓ Tổn thương hang.

Các tổn thương này tiến triển và dai dẳng.

Ngoài ra, có một số hình ảnh XQuang ngực như: “cây phế quản chứa khí”, “đám mờ tập trung”, “vùng tăng mật độ” có thể cũng được chẩn đoán viêm phổi (kết hợp lâm sàng phù hợp).

\* *Triệu chứng vi sinh:* Giống tiêu chuẩn chẩn đoán VPBV (mục 2.1.1.3.1)



\* *Tiêu chuẩn suy giảm miễn dịch:*

- ✓ Những BN bị giảm bạch cầu đa nhân trung tính được xác định là số lượng bạch cầu trung tính tuyệt đối hoặc tổng số lượng bạch cầu  $< 500/\text{mm}^3$ .
- ✓ Những BN mắc bệnh bạch cầu, ung thư hạch hoặc người nhiễm HIV dương tính với số lượng bạch cầu CD4  $< 200/\text{mm}^3$ .
- ✓ Những BN bị cắt lách.
- ✓ Những BN đang sử dụng steroid (trừ steroid dạng hít) hàng ngày  $> 2$  tuần.

### **2.1.2. Địa điểm nghiên cứu**

Khoa Hồi sức tích cực BV Thanh nhân và khoa Cấp cứu A9 BV Bạch mai.

### **2.1.3. Thời gian nghiên cứu**

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 8/2018 đến tháng 02/2021.

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.2.1. Thiết kế nghiên cứu**

- Nghiên cứu can thiệp, tiền cứu, có so sánh nhóm chứng.
- Bệnh nhân được chia ngẫu nhiên chia thành 2 nhóm:
  - Nhóm nghiên cứu: được thực hiện kỹ thuật multiplex realtime PCR đối với các VK gây bệnh thường gặp trên bệnh phẩm đờm, dịch khí phế quản: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.
  - Nhóm chứng: không thực hiện kỹ thuật multiplex realtime PCR.
- Bệnh nhân cả 2 nhóm là những BN khi có triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng nghi ngờ VPBV, VPLQTM đều được lấy đờm, dịch phế quản ngay để nuôi cấy VK thường qui (với nhóm nghiên cứu được thực hiện thêm multiplex realtime PCR).
- Cỡ mẫu nghiên cứu: Sử dụng công thức tính cỡ mẫu cho 2 tỷ lệ:

$$n = \frac{\left( z_{\alpha/2} \sqrt{2\bar{p}(1-\bar{p})} + z_{\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right)^2}{\Delta^2}$$

Trong đó:

- n số bệnh nhân của mỗi nhóm nghiên cứu.
- $z_{\alpha/2}$  là trị số z của phân phối chuẩn cho xác suất  $\alpha/2$  ( $\alpha = 0,05$  thì  $z_{\alpha/2} = 1,96$ ).
- $z_{\beta}$  là trị số z của phân phối chuẩn cho xác suất  $\beta$  ( $\beta = 0,02$  thì  $Z_{\beta} = 0,842$ ).
- $p_2$  là tỷ lệ tử vong do VPLQTM đã được nghiên cứu. Theo các nghiên cứu trong và ngoài nước đến thời điểm hiện tại chúng tôi ước lượng tỷ lệ này là  $p_2 = 0,35^{14}$ .
- $p_1$  là tỷ lệ tử vong do VPLQTM ở nhóm nghiên cứu mà nghiên cứu mong muốn. Chúng tôi mong muốn giảm được tỷ lệ tử vong ở nhóm BN này sau can thiệp 17% ( $p_1 = 0,18$ )<sup>123</sup>.
- $\Delta$  hiệu số của  $p_2$  và  $p_1$

Từ đó, thay vào công thức trên, chúng tôi tính được cỡ mẫu nhỏ nhất cho mỗi nhóm trong nghiên cứu là  $n \approx 105$  BN.

- Phương pháp chọn mẫu:

- Các BN có đủ tiêu chuẩn chọn sẽ được lấy ngẫu nhiên ở mỗi bệnh viện cho đến khi đủ cỡ mẫu nghiên cứu.
- Cách chọn mẫu ngẫu nhiên: Cho BN hoặc gia đình BN bắt thăm phong bì được dán kín, bên trong có đánh số: phong bì có số 1: được chọn vào nhóm nghiên cứu; phong bì có số 0: được chọn vào nhóm chứng.

### 2.2.2. Tiêu chí đánh giá của nghiên cứu

2.2.2.1. Mục tiêu 1: Nghiên cứu giá trị của multiplex realtime PCR trong chẩn đoán tác nhân gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy.

- So sánh khả năng phát hiện vi khuẩn gây bệnh VPBV, VPLQTM thường gặp giữa 2 kỹ thuật: nuôi cấy thường quy và multiplex realtime PCR.

- So sánh thời gian trả kết quả giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy.

- So sánh sự đồng thuận giữa kết quả multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy dương tính.

- Giá trị chẩn đoán của kỹ thuật multiplex realtime PCR: độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị dự đoán dương tính, giá trị dự đoán âm tính, chỉ số khả dĩ dương tính, chỉ số khả dĩ âm tính, chỉ số Kappa.

#### *2.2.2.2. Mục tiêu 2: Phân tích vai trò của multiplex realtime PCR trong theo dõi điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy*

- So sánh sử dụng kháng sinh phù hợp giữa hai nhóm nghiên cứu

- So sánh thời gian thở máy, thời gian nằm khoa Hồi sức tích cực, thời gian nằm viện ở cả hai nhóm nghiên cứu.

- So sánh tỷ lệ tử vong chung, tỷ lệ tử vong do VPLQTM,

- Đánh giá hiệu quả điều trị bằng các chỉ số giảm nguy cơ tương đối RRR, giảm nguy cơ tuyệt đối ARR, số BN cần sử dụng kỹ thuật multiplex realtime PCR (NNT) để giảm một BN tử vong do VPLQTM.

#### **2.2.3. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu**

##### *2.2.3.1. Kỹ thuật hút đờm kín lấy bệnh phẩm*

###### Mục đích:

- ✓ Làm sạch phế quản và ngăn ngừa tắc nghẽn đường thở do đờm.
- ✓ Lấy bệnh phẩm là dịch khí phế quản làm xét nghiệm.

###### Các bước chuẩn bị:

###### ❖ *Bệnh nhân:*

+ Động viên giải thích cho người bệnh hoặc người nhà để người bệnh yên tâm tin tưởng và hợp tác khi tiến hành kỹ thuật.

+ Hướng dẫn người bệnh ho, thở sâu, vỗ rung (nếu tình trạng bệnh cho phép).

- + Tư thế người bệnh thích hợp, thuận tiện cho kỹ thuật.
- + Trải khăn dưới cằm người bệnh
- + Tăng ôxy 100% cho người bệnh trước hút 2-3 phút

❖ *Nhân lực:*

- + Điều dưỡng được đào tạo chuyên ngành Hồi sức cấp cứu

❖ *Dụng cụ- thuốc- vật tư:*

- + Máy hút áp lực âm đầy đủ dây 2.
- + Ống hút dịch hệ thống kín cỡ phù hợp: 1-2 cái .
- + Bơm kim tiêm các cỡ.
- + Nước muối sinh lý 0,9% hoặc Natribicacbonnat 0,14%.
- + Gạc vô khuẩn: 01 gói.
- + 1-2 đôi găng tay sạch.
- + Dung dịch sát khuẩn tay nhanh.
- + Xà phòng rửa tay diệt khuẩn.
- + Xô đựng dung dịch khử khuẩn sơ bộ (nếu cần).
- + Khăn bông (hoặc khăn giấy).
- + Mornitor theo dõi liên tục mạch, huyết áp, SpO2 ..
- + Bóng Ambu, mặt nạ bóp bóng.
- + Bộ dụng cụ đặt nội khí quản cấp cứu.
- + Cốc bẫy đờm dung tích 20ml vô khuẩn có 2 đường hút để nối với máy hút và ống nội khí quản- mở khí quản của người bệnh
- + Các loại tuýp nhựa thể tích 5- 10ml vô khuẩn dùng một lần để chia bệnh phẩm gửi xét nghiệm.

*Thực hiện kỹ thuật:*

- ❖ Người bệnh nằm ngửa, trải khăn vô khuẩn trước ngực
- ❖ Điều dưỡng bật máy hút điều chỉnh áp lực hút. Tăng oxy 100% cho người bệnh trước hút 2-3 phút.

❖ Điều dưỡng thực hiện kỹ thuật rửa tay sát khuẩn, đội mũ đeo khẩu trang, đi găng, nối máy hút với cốc bẫy đờm và với sonde hút đờm kín của BN.

+ Mở khóa hệ thống hút, nhẹ nhàng đưa ống hút vào cho tới khi có sức cản thì rút ra khoảng 1 cm và ấn van hút. Kéo nhẹ ống hút từ từ ra ngoài đồng thời xoay nhẹ ống hút.

+ Khi quan sát thấy hút bệnh phẩm cốc bẫy đờm đã đủ bệnh phẩm ( $\geq 2\text{ml}$ ) tháo dây hút, đậy nắp cốc bẫy đờm hút kín, xoay chặt nắp để bệnh phẩm không mất đi trong quá trình vận chuyển và đựng trong thùng xốp có nhiều lớp, bảo quản lạnh để gửi xét nghiệm.

+ Có thể lặp lại động tác hút đến khi sạch đờm.

+ Vừa hút vừa quan sát BN và mornitor theo dõi để có thể ngừng hút và cấp cứu BN kịp thời. Hút 3 tư thế: ngửa thẳng, nghiêng phải, nghiêng trái.

+ Mỗi lần hút đờm không kéo dài quá 5 phút.

+ Thực hiện xong thủ thuật và hết đờm thì khóa hệ thống hút kín, tháo dây hút. Tháo bỏ ống hút, tráng sạch dây máy hút, tắt máy, ngâm ống hút vào xô đựng dung dịch khử khuẩn, ngâm đầu dây vào chai nước muối rửa.

+ Tháo bỏ găng, đặt người bệnh tư thế thoải mái, nằm đầu cao  $30^0$ .

+ Nghe phổi, đánh giá tình trạng hô hấp sau hút đờm, đưa dần oxy về thông số trước hút..

+ Thu dọn dụng cụ, rửa tay, gửi xét nghiệm.

Theo dõi và xử trí tai biến trong và sau khi hút đờm:

+ Tình trạng ứ đọng, tiếng thở, nhịp thở, SpO<sub>2</sub>, sắc mặt, ý thức, nhịp tim, mạch, huyết áp, tình trạng máy thở, khí máu (nếu có chỉ định).

+ Vừa hút vừa động viên người bệnh.

+ Chỉ bơm rửa trong trường hợp bệnh nhân có đờm đặc.

+ Đảm bảo toàn bộ ống hút được kéo hết khi hút xong.

- + Số lần hút tùy theo lượng đờm, 1 lần hút không quá 20", bít van hút không quá 15", giữa các lần hút cho BN thở máy lại 30"- 1phút, 1 đợt hút  $\leq$  5 phút
- + Thực hiện kỹ thuật phải đảm bảo đúng quy trình.
- + Theo dõi sát dấu hiệu sinh tồn trong khi hút, nếu mạch chậm  $<$  40 nhịp/ phút phải ngừng hút tăng oxy 100%.

### 2.2.3.2. Kỹ thuật nội soi phế quản ống mềm lấy bệnh phẩm

#### Mục đích:

- ✓ Làm sạch phế quản và ngăn ngừa tắc nghẽn đường thở do đờm.
- ✓ Lấy bệnh phẩm là dịch khí phế quản, dịch rửa phế quản phế nang BAL làm xét nghiệm.

#### Các bước chuẩn bị:

##### ❖ Bệnh nhân:

+ BN cần phải làm đầy đủ các xét nghiệm tế bào máu ngoại vi, đông máu cơ bản, đo chức năng hô hấp, ghi điện tâm đồ, có các phim chụp phổi thường quy thẳng, nghiêng và phim chụp cắt lớp vi tính (nếu cần).

+ BN được thở chế độ kiểm soát hoàn toàn với oxy 100% không sử dụng PEEP, được dùng thuốc an thần giãn cơ nếu cần. Có thể tăng thể tích khí lưu thông Vt từ 40- 50%.

+ BN được lắp đoạn ống nội mềm linh hoạt hình chữ L, nối giữa ống máy thở và ống nội khí quản (hoặc mở khí quản) có lỗ để đưa ống soi qua mà vẫn đảm bảo thở máy trong quá trình nội soi.

+ Dùng ống nội soi mềm có đường kính ngoài bằng 2/3 đường kính trong của ống nội khí quản hoặc canuyn mở khí quản.

+ Gây tê khí phế quản với lidocain 2% bơm qua ống nội khí quản hoặc canuyn mở khí quản. Tiêm bắp atropin 1/4mg x 1 ống trước soi 30 phút để phòng phản xạ của thần kinh X.

+ Giải thích về thủ thuật soi phế quản: các tai biến có thể xảy ra và quy trình nội soi phế quản để cùng phối hợp thực hiện và phải được ký cam kết của người nhà.

❖ Chuẩn bị phương tiện:

- + Hệ thống ống nội soi phế quản ống mềm Olympus các cỡ có gắn camera.
- + Hệ thống nguồn sáng, máy hút
- + Mornitor theo dõi dấu hiệu sinh tồn.

❖ Thuốc- vật tư:

- + Thuốc gây tê: Lidocain 1-2%
- + Thuốc gây mê: Midazolam, propofol, ketamin..
- + Khác: Atropin, adrenalin..
- + Gel bôi trơn, dịch truyền, bơm kim tiêm các cỡ..
- + Găng tay vô khuẩn.
- + Lọ nhựa vô khuẩn dung tích 50- 100ml dùng một lần bằng nhựa có nắp vòi hình chữ T để lấy bệnh phẩm là dịch rửa phế quản phế nang: một đầu gắn với máy hút, một đầu gắn với kênh hút của ống nội soi.
- + Các loại tuýp nhựa thể tích 5- 10ml vô khuẩn dùng một lần để chia bệnh phẩm gửi xét nghiệm.

Thực hiện kỹ thuật:

- ❖ Người bệnh nằm ngửa.
- ❖ Luôn ống soi qua lỗ của ống nối chữ L vào trong lòng nội khí quản hoặc canuyn mở khí quản. Luôn đảm bảo ống soi đi giữa lòng phế quản.
- ❖ Tùy vào tổn thương trên phim XQuang ngực (hoặc phim CT ngực) và hình ảnh quan sát được trong quá trình nội soi mà có thể tiến hành kỹ thuật bơm rửa phế quản phế nang lấy bệnh phẩm. Nguyên tắc khi soi phế quản: soi bên không bị tổn thương trước. Nếu tình trạng người bệnh không cho phép tiên lượng không soi được đầy đủ cả hai bên thì mới ưu tiên soi bên tổn thương để lấy bệnh phẩm. Nếu không rõ bên tổn thương hoặc tổn thương lan tỏa cả hai bên thì soi bên phải trước.
- ❖ Sau khi đã luôn được ống nội soi vào vị trí cần lấy bệnh phẩm, nối máy hút với cốc bẫy đờm có nắp gắn 2 đầu ống: một đầu nối với máy hút, một đầu

nối với kênh hút của ống soi. Bơm khoảng 20ml nước muối sinh lý 0,9% vào phân thủy phổi tổn thương, sau đó hút ra, dịch hút sẽ rơi vào cốc bẫy đờm này.

- ❖ Tháo rời lọ đựng dịch hút, xoáy chặt nắp cốc đờm để bệnh phẩm không mất đi trong quá trình vận chuyển và đựng trong thùng xốp có nhiều lớp, bảo quản lạnh chuyên đi thực hiện ngay các kỹ thuật nuôi cấy vi khuẩn thường qui tại khoa vi sinh- bệnh viện Thanh nhàn.
- ❖ Trong quá trình soi phải quan sát và theo dõi các thông số: SpO<sub>2</sub>, mạch, huyết áp. Nếu SpO<sub>2</sub> < 90% phải tạm dừng soi. Có thể gây tê bổ sung lidocain 2% trong quá trình soi nếu Bệnh nhân kích thích tránh để bệnh nhân ho gây chấn thương đường thở. Tổng liều < 200mg.
- ❖ Sau khi soi xong đưa dần các chỉ số máy thở về thông số trước soi.

Theo dõi và xử trí tai biến sau nội soi:

Đi ứng lidocain, thiếu oxy, chảy máu, tràn khí màng phổi.

***Vận chuyển mẫu:***

Sau khi hút đờm/dịch phế quản sẽ được đựng trong ống nghiệm vô khuẩn có nắp xoáy kín: được đựng trong thùng xốp lạnh chuyên ngay tới khoa vi sinh- bệnh viện Thanh Nhàn để thực hiện kỹ thuật nuôi cấy VK thường qui và multiplex realtime PCR phát hiện 5 loại VK gây bệnh. Thời gian vận chuyển từ 15 phút đến 30 phút.

*2.2.3.3. Kỹ thuật multiplex realtime PCR phát hiện 5 loại vi khuẩn thường gặp gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy*

Nguyên lý kỹ thuật:

○ PCR là kỹ thuật tổng hợp DNA dựa trên nguyên lý tổng hợp DNA trong tế bào, trong đó DNA được nhân lên theo cơ chế bán bảo tồn, bắt cặp của Watson- Crick.



○ *Realtime PCR* là kỹ thuật PCR mà kết quả khuếch đại DNA được hiển thị cùng một lúc với phản ứng sau mỗi chu kỳ nhiệt nhờ sử dụng chất huỳnh quang phát sáng gắn vào đoạn DNA đích, số lượng của sản phẩm khuếch đại tỷ lệ thuận với cường độ tín hiệu huỳnh quang.

○ *Multiplex realtime PCR*: sử dụng nhiều đoạn DNA đích đặc trưng cho nhiều loại VK được phát hiện đồng thời trong cùng một phản ứng. Trong nghiên cứu này chúng tôi phát hiện 5 loại VK.

○ *Quy trình định lượng PCR*: Số lượng DNA VK ban đầu có trong phản ứng được xác định dựa vào một đường chuẩn. Đường chuẩn này được xây dựng từ giá trị Ct (chu kỳ ngưỡng) của 4 hỗn hợp phản ứng có nồng độ khác nhau ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$ ) của các đoạn DNA amplicon mô phỏng vùng gen của VK được nhân bản. Giá trị sử dụng cho trục tung của đường chuẩn là giá trị Ct, giá trị sử dụng cho trục hoành của đường chuẩn là số lượng bản sao trình tự mục tiêu ban đầu. Lượng trình tự mục tiêu ban đầu có trong ống phản ứng ứng với mẫu xét nghiệm được xác định dựa vào đường chuẩn và giá trị Ct thu được của mỗi mẫu xét nghiệm.

Vật liệu nghiên cứu:

+ *Bệnh phẩm*: đờm, dịch phế quản được bảo quản lạnh và vận chuyển ngay tới phòng xét nghiệm. Mẫu được xử lý tách chiết DNA sau khi nhận được và bảo quản ở  $-20^{\circ}\text{C}$  trong khi chờ đợi chuẩn bị các thành phần của hỗn hợp realtime PCR. Mỗi mẫu được xử lý và thực hiện đảm bảo thời gian trả lời kết quả từ 3- 5 giờ.

+ Trình tự prime- probe sử dụng trong nghiên cứu

**Bảng 2.1.** Trình tự Primer-Probe sử dụng trong nghiên cứu

Chủng mục tiêu	Tên	Trình tự (5'→3')	Chiều dài	Tm	GC%
<i>E. coli</i>	<i>yccT</i> -F	ATCGTGACCACCTTGATT	18	53.37	44.44
	<i>yccT</i> -R	TACCAGAAGATCGACATC	18	50.30	44.44
	<i>yccR</i> -P	CATTATGTTTGCCGGTATCCGTTT	24	56	41.7
<i>K. pneumoniae</i>	<i>gltA</i> -F	AGGCCGAATATGACGAAT	18	53.34	44.44
	<i>gltA</i> -R	GGTGATCTGCTCATGAA	17	50.68	47.06
	<i>gltA</i> -P	ACTACCGTCACCCGCCACA	19	61.4	63.2
<i>P. aeruginosa</i>	<i>gyrB</i> -F	CCTGACCATCCGTCGCCACAAC	22	65.88	63.64
	<i>gyrB</i> -R	CGCAGCAGGATGCCGACGCC	20	69.08	75.00
	<i>gyrB</i> -P	CCGTGGTGGTAGACCTGTTCCCAGAC C	27	65.5	63.00
<i>A. baumannii</i>	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i> F primer	GAAGTGAAGCGTGTTGGTTATG	22	55.0	45.00
	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i> R primer	GCCTCTTGCTGAGGAGTAAT	20	55.0	50.00
	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i> Probe	GCCTCTTGCTGAGGAGTAAT	20	54.3	50
<i>Staphylococci</i>	<i>tufSA</i> -F	AAACAACCTGTTACTGGTGTAGAAATG	26	53.8	34.6
	<i>tufSA</i> -R	AGTACGGAAATAGAATTGTG	20	47.3	35
	<i>tufSA</i> -P	TCCGTAAATTATTAGACTACGCTGAA GC	28	56.5	39.3
<i>S. aureus</i>	<i>nuc</i> -F	CATCCTAAAAAAGGTGTAGAGA	22	49.7	36.4
	<i>nuc</i> -R	TTCAATTTTMTTTCATTTTCTACCA	26	51.6	25
	<i>nuc</i> -P	TTTTCGTAAATGCACTTGCTTCAGGA CCA	29	60.7	41.4
<i>Kháng methicillin</i>	<i>mecA</i> -F	GGCAATATTAMCGCACCTCA	20	54.1	47.5
	<i>mecA</i> -R	GTCTGCCASTTTCTCCTTGT	20	54.9	50
	<i>mecA</i> -P	AGATCTTATGCAAACCTTAATTGGCAA ATCC	30	56.5	33.3

+ Mẫu vi khuẩn: Danh sách các chủng VK chuẩn được sử dụng trong nghiên cứu

**Bảng 2.2.** Danh sách các chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu

Tên	Loại mẫu	Nguồn mẫu
<i>A. baumannii</i>	Chủng chuẩn ATCC@19606	Khoa Thương
<i>S. epidermidis</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>P. aeruginosa</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>K. pneumoniae</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>Escherichia coli</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>S.aureus</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>Listeria monocytogenes</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Listeria ivanovii</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Campylobacter coli</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Campylobacter jejuni</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Chlamydia trachomatis</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Vibrio cholerae</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Helicobacter pylori</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Shigella boydii</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Shigella sonnei</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Streptococcus agalactiae</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Salmonella typhimurium</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Salmonella paratyphi</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Clostridium botulinum</i>	DNA	Khoa Thương

+ Mẫu amplicon:

Phân tử DNA mạch đôi, có kích thước mô phỏng vùng các gene mục tiêu, được tổng hợp bởi Intergrated DNA Technologies. Amplicon được pha loãng về các nồng độ thấp hơn theo bậc pha loãng 10 bằng TE 1X

**Bảng 2.3.** Trình tự các amplicon được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên	Trình tự primer	Size (bp)
1	yccT	5'- GTTGG CATGG CGGCG CGCGT CTTTG CAGCG TACCA GAAGA TCGAC ATCGG TTGAA AGCCG CAGCG TGGTG GCAAA AACGG ATACC GGCAA ACATA ATGCA ATCAA GGTGG TCACG ATAGT GGCGA TGA CTGGA A -3'	137
2	glytA	5'- AAGCG GAGCC GGC GG CAAAG ACAAG CCGGC GACGT CCTTA TAGGC CGAAT ATGAC GAATT CAAAA CTACC GTCAC CCGCC ACACC ATGAT TCATG AGCAG ATCAC CCCGG TGTTG ATGGC ATGGC GCCAG TTTA TCA -3'	138
3	GryB	5'- TTTAT CAAGA TTTAG CTCGT CGTAT TGGAC TTGAA CTCAT GTCTA ATGGC GCCAG TTTAT CATA CATAAC CTGAC CATCC GTCGC CACAA CAAGG TCTGG GAACA GGTCT ACCAC CACGG CGTTC CGCAG TTCCC ACTGC GCGAA GTGGG CGAGA CCGAT GGCTC CGGCA CCGAA GTTCA CTTCA AGCCG TCCCC GGAGA CCTTC AGCAA CATCC ACTTC AGTTG GGACA TCCTG GCCAA GCGCA TCCGC GAGCT GTCCT TCCTC AACTC CGGCG TCGGC ATCCT GCTGC GAGTG GCGAT GACTC TGGAA-3'	310
4	blaOXA-51	5'- TTTAT CAAGA TTTAG CTCGT CGTAT TGGAC TTGAA CTCAT GTCTA AGGAA GTGAA GCGTG TTGGT TATGG CAATG CAGAT ATCGG TACCC AAGTC GATAA TTTT GGCTG GTGGG TCCTT TAAAA ATTAC TCCTC AGCAA GAGGC ACAG CT -3'	152
5	Nuc_mecA	5'- AACA AAGC ATCC TAAA AAAG GTGT AGAG AAAT ATGG TCCT GAAG CAAG TGCA TTTA CGAA AAAA ATGG TAGA AAAT GCAA AGAA AATT GAAG TCGA GTCC AACG TGAT TGCA GCGA TAAT AGAA GCTA TCCA CAAA CGAA TTTC GCAG TGTC CACC TCAG AAAC ACGC CCAG TATT GACT GGTG TGAA CTAA TAAT GGCA ATAT TAAC GCAC CTCA CTTA TTAA AAGA CACG AAAA ACAA AGTT TGGA AGAA AAAT ATTA TTTC CAAA GAAA ATAT CAAT CTAT TAAC TGAT GGTA TGCA ACAA GTCG TAAA TAAA ACAC ATAA AGAA GATA TTTA TAGA TCTT ATGC AAAC TTAA TTGG CAAA TCCG GTAC TGCA GAAC TCAA AATG AAAC AAGG AGAA ACTG GCAG ACAA ATT -3'	415

Thiết bị nghiên cứu, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

- ✓ Bộ mồi và sinh phẩm hóa chất multiplex realtime PCR của công ty công nghệ sinh học Khoa Thương. Bộ mồi của mỗi VK đều được được thiết kế

theo quy trình chuẩn quốc tế có độ ổn định cao, hiệu suất nhân bản đạt > 95%, độ nhạy phân tích LOD95 được tính toán bằng phần mềm PODLOD calculation program, version 9, độ đặc hiệu được kiểm tra trên các chủng chuẩn (Xin xem chi tiết ở phần phụ lục).

- ✓ Bộ hóa chất tách chiết DNA AccuRivesDNA PrepKit- EX- DNA02.1F của công ty Khoa Thương.
- ✓ Vật dụng tiêu hao (găng tay không phân, ống eppendorf 1,5 ml, đầu tip dùng cho micropipettes có phin lọc)
- ✓ Micropipettes (10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l)
- ✓ Máy realtime PCR (đọc được các màu FAM, HEX)+ hệ thống máy vi tính
- ✓ Máy ly tâm cho ống eppendorf (vận tốc tối đa 13.000 - 14.000 vòng/phút)
- ✓ Máy ly tâm ống máu
- ✓ Máy lắc trộn (vortex)
- ✓ Bồn ủ nhiệt khô
- ✓ Tủ lạnh 4°C và -20°C.
- ✓ Nước cất 2 lần

Các bước tiến hành: (Xin xem trong phần phụ lục)

❖ *Nhận định kết quả:*

Kết quả được xác định là dương tính khi có số lượng  $\geq 10^3$  DNA/ml bệnh phẩm đối với dịch rửa phế quản phế nang;  $\geq 10^4$  DNA/ml bệnh phẩm đối với bệnh phẩm là đờm/ dịch hút qua nội khí quản/ canuyn mở khí quản<sup>66,67</sup>.

❖ Cách kiểm soát và đảm bảo chất lượng xét nghiệm (Xin xem thêm trong phần phụ lục)

- Đảm bảo quy trình lấy bệnh phẩm, tránh bội nhiễm (vô khuẩn, kín).
- Sử dụng bộ sinh phẩm ổn định, có khả năng nhân bản gen mục tiêu, không phát hiện nhân bản và bắt cặp chéo với các gen khác.

- Giới hạn phát hiện (LOQ95): Quy trình phát hiện và định lượng các vi khuẩn *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii* và *E.coli* với độ nhạy lần lượt là 44,67; 4,23 và 3,34 bản sao/ phản ứng với khoảng khuếch đại từ 10 đến 1.000.000 bản sao. Độ nhạy của quy trình trên các gen mục tiêu *mecA*, *nuc* và *tuf* (của *S.aureus*, *S.coagulase* âm và *S.aureus* kháng *methicillin*) lần lượt là 7,11; 4,67 và 181,85 bản sao/ phản ứng.

- Độ đặc hiệu được thực hiện trên các chủng chuẩn vi khuẩn: *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii* và các vi khuẩn thuộc nhóm *Staphylococci* đặc hiệu với chủng mục tiêu. Chỉ riêng đối với *E.coli* có xảy ra phản ứng chéo với *Shigella*. Tuy nhiên, phản ứng chéo này không ảnh hưởng đến kết quả vì *Shigella* thường không có ở bệnh phẩm đường hô hấp.

- Ngoài ra, quy trình còn chứa một cặp môi và mẫu dò TaqMan đặc hiệu cho một đoạn DNA nhân tạo có trình tự khác trình tự gen của các chủng mục tiêu gọi là chứng nội ngoại sinh (internal control, IC). Chứng nội sẽ được tách chiết cùng với DNA nhằm phát hiện các chất ức chế có trong mẫu bệnh phẩm và kiểm soát hiệu quả của quá trình tách chiết DNA cũng như phản ứng PCR.

#### 2.2.3.4. Kỹ thuật nuôi cấy định lượng vi khuẩn:

- Bệnh phẩm (đờm, dịch hút NKQ/ MKQ hoặc dịch rửa phế quản phế nang sẽ được nuôi cấy định lượng VK thường qui theo quy trình chung của Bộ y tế.

- Kết luận VK gây bệnh khi số lượng VK  $\geq 10^3$  cfu/ml đối với bệnh phẩm dịch rửa phế quản phế nang qua nội soi phế quản;  $\geq 10^4$  cfu/ml với bệnh phẩm là đờm/ dịch hút qua nội khí quản/ canuyn mở khí quản.

- Định danh VK bằng bộ kit định danh Api 20E, Api 20NE, ApiStap, Api Strep.

- Xác định mức độ kháng thuốc của VK bằng kỹ thuật kháng sinh khuếch tán trên thạch; MIC đối với colistin và vancomycin bằng E test.

- Quy trình nuôi cấy vi khuẩn và làm kháng sinh đồ được kiểm soát thường xuyên theo các bước chuẩn:

- ✓ Quy trình lấy bệnh phẩm đờm, dịch phế quản được đảm bảo kín, vô khuẩn tuyệt đối và an toàn. Bệnh phẩm được soi, kiểm tra đảm bảo chất lượng trước khi cấy.
- ✓ Kiểm soát chất lượng môi trường nuôi cấy (Quality control- QC): Được thực hiện theo lô sản xuất, khi nhập lô mới hoặc khi có nghi ngờ về kết quả xét nghiệm (Ngoài việc kiểm soát chất lượng của công ty sản xuất). Khoa Vi sinh cũng tự kiểm tra trên các chủng chuẩn.
- ✓ Kiểm soát định danh VK và kháng sinh đồ tự động:
  - Khoa Vi sinh bệnh viện Thanh nhân sử dụng máy MicroScan WalkAway- 40 plus (hãng Beckman Coulter- Đức).
  - Sử dụng các chủng chuẩn để kiểm soát: E.coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Enterococcus faecalis ATCC 51299.

### **2.3. Tiến hành nghiên cứu**

#### **2.3.1. Quy trình nghiên cứu**

- ❖ BN sau khi nhập viện:
  - Được khai thác đặc điểm chung như tất cả các BN: Tuổi, giới, BMI, lý do nhập viện, điểm Glasgow...
- ❖ Và/hoặc đặt nội khí quản, thở máy  $\geq 48$  giờ lâm sàng nghi ngờ có VPBV, VPLQTM sẽ được:
  - Thăm khám phát hiện các triệu chứng lâm sàng: Ho, sốt, khó thở, khạc đờm mủ hoặc tăng số lượng đờm, nghe phổi có thể thấy ran ẩm, tiếng thổi ống
  - Thăm khám tình trạng huyết động, mạch, huyết áp, sóc..

+ Thực hiện các xét nghiệm cơ bản: tế bào máu ngoại vi, chức năng gan thận, khí máu động mạch đánh giá các thông số PaO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, A-aDO<sub>2</sub>, chụp XQuang ngực thường qui, chụp CT scanner ngực nếu cần thiết...

❖ BN đủ tiêu chuẩn, đồng ý tham gia nghiên cứu được lựa chọn vào nghiên cứu.

**Nhóm nghiên cứu:**

**\* Lần một:**

✓ Bệnh nhân sẽ được lấy bệnh phẩm (đờm, dịch hút qua nội khí quản hoặc dịch rửa phế quản phế nang BAL) gửi đến khoa vi sinh thực hiện đồng thời:

+ Nuôi cấy định lượng VK và kháng sinh đồ thường qui.

+ Và kỹ thuật multiplex realtime PCR xác định 5 loại VK gây bệnh: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

✓ Khi có kết quả multiplex realtime PCR (3-7 giờ) phù hợp với lâm sàng BN sẽ được điều trị theo phác đồ dựa theo kết quả multiplex realtime PCR cho đến khi có kết quả nuôi cấy (Bảng 2.10).

✓ Khi có kết quả nuôi cấy và kháng sinh đồ (2-4 ngày):

+ Giữ nguyên phác đồ kháng sinh đang sử dụng (nếu kết quả nuôi cấy VK và kháng sinh đồ phù hợp với kết quả multiplex realtime PCR đang áp dụng điều trị).

+ Điều chỉnh phác đồ sử dụng kháng sinh theo kết quả nuôi cấy VK và kháng sinh đồ (nếu phác đồ điều trị theo kết quả multiplex realtime PCR đang được áp dụng điều trị BN chưa phù hợp).

\* **Lần hai:** sau lần một 5 ngày (đối với các BN còn đang điều trị tại khoa hồi sức, chưa bỏ được máy thở, chưa rút ống nội khí quản)



- ✓ BN sẽ được lấy bệnh phẩm lần hai (đờm, dịch hút qua nội khí quản hoặc dịch rửa phế quản phế nang - BAL) thực hiện thực hiện đồng thời:
  - + Nuôi cấy định lượng VK và kháng sinh đồ thường qui.
  - + Và multiplex realtime PCR xác định 5 loại VK gây bệnh: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.
- ✓ BN tiếp tục được điều chỉnh phác đồ khi có kết quả multiplex realtime PCR, kết quả nuôi cấy VK và kháng sinh đồ như lần một cho đến khi bỏ máy thở, rút nội khí quản, chuyển khoa, khỏi ra viện hoặc tử vong.

#### **Nhóm chứng:**

- ✓ BN sẽ được lấy bệnh phẩm (đờm, dịch hút NKQ/MKQ hoặc dịch rửa phế quản phế nang- BAL) nuôi cấy VK và làm kháng sinh đồ.
- ✓ BN được điều trị kháng sinh dựa theo kinh nghiệm cho đến khi có kết quả nuôi cấy (2-4 ngày) thì sẽ được điều chỉnh theo kết quả này.
- ❖ Cả hai nhóm sẽ được thu thập số liệu theo mẫu bệnh án thống nhất, phân tích và xử lý bằng các phần mềm thống kê y học.

### **2.3.2. Phác đồ điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy áp dụng trong nghiên cứu<sup>18,124</sup>**

#### **2.3.2.1. Nguyên tắc điều trị**

- ❖ Khi BN về lâm sàng và/ hoặc có kết quả multiplex realtime PCR nghi ngờ và/hoặc đã chẩn đoán xác định VPBV, VPLQTM:
  - Điều trị kháng sinh càng sớm càng tốt, kháng sinh phải được chỉ định sớm nhất có thể được (trong 1 giờ đầu nếu có kèm theo sốc nhiễm khuẩn).
  - Nếu chưa có kết quả nuôi cấy vi khuẩn có thể điều trị kháng sinh ban đầu:
    - + Dựa theo kinh nghiệm (khi chưa có kết quả multiplex realtime PCR): Các KS được chọn phải bao phủ được các VK có khả năng gây bệnh và chọn

KS nên dựa vào dữ liệu VK và mức độ nhạy cảm kháng sinh của VK tại mỗi BV. Việc lựa chọn kháng sinh ban đầu cũng cần dựa vào mức độ nặng của viêm phổi và nguy cơ nhiễm VK đa kháng<sup>18</sup>.

+ Khi đã có kết quả multiplex realtime PCR:

Lựa chọn kháng sinh theo phác đồ (bảng 2.10)

- Điều chỉnh kháng sinh sau khi có kết quả nuôi cấy và kháng sinh đồ:

+ Đánh giá hiệu quả của điều trị ban đầu sau 48- 72 giờ<sup>18</sup>.

+ Nếu BN đáp ứng điều trị và kháng sinh ban đầu phù hợp với kháng sinh đồ thì giữ nguyên phác đồ. Nếu BN không đáp ứng với điều trị và kháng sinh ban đầu không phù hợp cần điều chỉnh kháng sinh theo kết quả kháng sinh đồ.

+ Nếu BN không đáp ứng với điều trị mặc dù kháng sinh đang dùng phù hợp với kết quả kháng sinh đồ thì cần làm lại xét nghiệm vi sinh, tìm ổ di bệnh hoặc một nguyên nhân khác gây sốt.

- Thời gian dùng kháng sinh:

+ Thời gian điều trị thông thường là 7 ngày. Thời gian điều trị có thể kéo dài đến 15- 21 ngày tùy theo loại VK và cơ địa BN, đáp ứng lâm sàng.

- Điều trị khác: Ngoài việc sử dụng kháng sinh cần đảm bảo điều trị cơ bản toàn diện trong hồi sức:

+ Điều trị sốc nhiễm khuẩn, đảm bảo oxy hóa máu trong hội chứng suy hô hấp cấp tiến triển (ARDS) theo phác đồ.

+ Lọc máu được chỉ định loại bỏ cytokin, toan chuyển hóa, suy đa tạng.

+ Phối hợp điều trị các bệnh lý nền đi kèm.

+ Cân bằng nước điện giải, cân bằng kiềm- toan.

+ Chăm sóc BN thở máy, dự phòng các biến chứng tắc mạch.

+ Đảm bảo dinh dưỡng, chống loét tỳ đè, chống loét dạ dày do stress.

2.3.2.2. Phác đồ kháng sinh điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy áp dụng trong nghiên cứu:

**Bảng 2.4.** Lựa chọn kháng sinh dựa trên kết quả multiplex realtime PCR

50,69,80,118,121

Tên vi khuẩn	Viêm phổi sớm, tình trạng LS ổn định, không có nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng	Viêm phổi muộn, có sốc nhiễm khuẩn, ARDS, có nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Meropenem: 1g/8h truyền TM hoặc Doripenem 0,5g/6h-8h truyền TM Và/hoặc Amikacin 15mg-20mg/kg/24h truyền TM 1 lần.	Meropenem: 2g/8h hoặc Doripenem 1g/8h truyền TM kéo dài 3h. Và Colistin liều nạp 5mg/kg x 1 lần; liều duy trì 2,5mg x (1,5 x độ thanh thải creatinin x 30)/12h truyền TM kéo dài 3h Và/hoặc Ampicillin/sulbactam: 3g/6h-8h truyền TM kéo dài 3h Và/hoặc Amikacin 15-20mg/kg/24h truyền TM 1 lần.
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Meropenem: 1g/8h truyền TM Và Amikacin 15mg- 20mg/kg/24h truyền TM 1 lần hoặc Gentamycin 5-7mg/kg/24h truyền TM 1 lần hoặc Tobramycin 5-7mg/kg/24h truyền TM 1 lần.	Meropenem: 2g/8h Doripenem 1g/8h truyền TM kéo dài 3h). Và Colistin liều nạp 5mg/kg x 1 lần; liều duy trì 2,5mg x (1,5 x độ thanh thải creatinin x 30)/12h truyền TM kéo dài 3h hoặc Ertapenem 1g/24h truyền TM 30 phút. Và/hoặc Amikacin 15-20mg/kg/24h truyền TM 1 lần Và/hoặc Fosfomycin 6-8g/8h truyền TM kéo dài 2h.
<i>Eschecheria coli</i>	Ceftazidime/ hoặc Cefepim: 2g/8h truyền TM hoặc Piperacillin/tazobactam 4,5g/6h truyền TM. Và Ciprofloxacin 400mg/8h/ hoặc	Imipenem: 500mg/6h hoặc 1g/8h truyền TM hoặc Meropenem 1-2g/8h truyền TM kéo dài 3h Hoặc Piperacillin/tazobactam

	Amikacin 15-20mg/kg/24h truyền TM 1 lần	4,5g/6h truyền TM. Và Ciprofloxacin 400mg/8h hoặc Amikacin 15-20mg/kg/24h truyền TM 1 lần Hoặc Colistin liều nạp 5mg/kg x 1 lần; liều duy trì 2,5mg x (1,5 x độ thanh thải creatinin x 30)/12h truyền TM kéo dài 3h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piperacillin/tazobactam 4,5g/6h-8h truyền TM hoặc Cefprozime hoặc Cefepim: 2g/8h truyền TM. Và Amikacin 15-20mg/kg/24h truyền TM 1 lần hoặc Levofloxacin 750mg- 1000mg/24h truyền TM.	Imipenem: 500mg/6h hoặc 1g/8h truyền TM hoặc Meropenem 1-2g/8h truyền TM kéo dài 3h. Và Colistin liều nạp 5mg/kg x 1 lần; liều duy trì 2,5mg x (1,5 x độ thanh thải creatinin x 30)/12h truyền TM kéo dài 3h Hoặc Amikacin 15-20mg/kg/24h truyền TM 1 lần Hoặc Ciprofloxacin 400mg/8h Hoặc Levofloxacin 750mg-1000mg/24h truyền TM
<i>Staphylococcus aureus</i>	Piperacillin/tazobactam 4,5g/6h-8h truyền TM hoặc cefepim: 2g/8h truyền TM. Và/hoặc Levofloxacin 750mg/24h truyền TM	Vancomycin: liều nạp 25–30 mg/kg, duy trì 15mg/kg/12h truyền TM kéo dài 1-2h; Hoặc Teicoplanin: liều nạp 12mg/kg/12h x 3 lần, duy trì 6–12mg/kg/24h truyền TM 1 lần; Hoặc Linezolid: 600mg/12h truyền TM.

(\*) Liều kháng sinh trong phác đồ sử dụng ở những BN có độ thanh thải creatinin máu >50ml/phút, liều này sẽ được điều chỉnh theo khuyến cáo mức độ giảm của độ thanh thải này.

(\*\*) Những BN VPBV, VPLQTM không có sốc và/hoặc không giảm oxy hóa máu sử dụng phác đồ ở cột viêm phổi sớm, tình trạng lâm sàng ổn định, không có nguy cơ nhiễm VK đa kháng.

### 2.3.3. Thu thập số liệu nghiên cứu

#### 2.3.3.1. Các thông số và thời điểm thu thập số liệu của 2 nhóm nghiên cứu

❖ Thời điểm lúc nhập viện:

- Tuổi, giới.
- Chỉ số khối cơ thể BMI, điểm Glasgow.
- Bệnh lý nền đi kèm và bệnh lý nguyên nhân nhập viện và/hoặc đặt

NKQ:

✓ Các bệnh lý nội khoa mạn tính: Bệnh tim mạch (tăng huyết áp, suy tim), bệnh lý hệ mạch não- nhân xám (tắc mạch não, xuất huyết não, sa sút trí tuệ..), bệnh lý hô hấp mạn tính (COPD, hen phế quản), bệnh lý nội tiết (đái tháo đường, suy thượng thận, baseudow..), bệnh lý hệ tiêu hóa (viêm loét dạ dày, tá tràng, trào ngược dạ dày thực quản, xơ gan do vi rút- rượu..).

✓ Các bệnh lý ngoại khoa: Phẫu thuật hệ thần kinh trung ương, phẫu thuật lồng ngực, phẫu thuật tiêu hóa, phẫu thuật xương..

✓ Các bệnh lý nền và yếu tố ảnh hưởng đến hệ miễn dịch: đái tháo đường, nghiện rượu, sử dụng corticoid đường tiêm- uống, bệnh ung thư, dùng các thuốc ức chế miễn dịch, bệnh lý bạch cầu, cắt lách, HIV.

❖ Thời điểm chẩn đoán VPBV, VPLQTM:

✓ VPBV, VPLQTM sớm, muộn.

✓ Các dấu hiệu lâm sàng: nhiệt độ, số lượng và tính chất đờm, tình trạng huyết động, nghe ran ở phổi, tình trạng phụ thuộc máy thở.

✓ Các xét nghiệm máu: xét nghiệm tế bào máu ngoại vi, các chỉ số đông máu, chức năng gan- thận, khí máu động mạch, các chỉ số viêm...

✓ Các xét nghiệm hình ảnh: Xquang phổi, CT scanner lồng ngực..

✓ Các xét nghiệm vi sinh: kết quả nuôi cấy vi khuẩn và kháng sinh đồ các loại bệnh phẩm đường hô hấp, máu, nước tiểu...

- Đánh giá mức độ nặng bằng thang điểm APACHE II, SOFA: tại thời điểm nhập viện và thời điểm chẩn đoán VPBV, VPLQTM.

### 2.3.3.2. Các chỉ số nghiên cứu:

#### ❖ Các chỉ số lâm sàng:

- Nhiệt độ cơ thể: Lấy nhiệt độ ngoại vi (cặp ở hố nách) cao nhất và thấp nhất trong 24 giờ (từ 8 giờ sáng hôm trước đến 8 giờ sáng hôm sau). Theo dõi và ghi nhận hàng ngày.

- Số lượng và tính chất đờm cũng được theo dõi trong 24h. Đánh giá theo các mức độ ít, nhiều, rất nhiều; màu sắc đờm đục, mù.

- Tình trạng huyết động: Tình trạng sốc, mạch, huyết áp, sử dụng thuốc vận mạch: đều được đánh giá và ghi nhận lúc 8 giờ sáng hàng ngày.

- Phụ thuộc máy thở: BN không thể bỏ được máy thở mặc dù bệnh lý nền là chỉ định phải thở máy đã cải thiện.

- Điều trị kháng sinh không phù hợp (là việc sử dụng kháng sinh bị kháng hoặc trung gian, không đủ liều hoặc khoảng cách các liều quá xa nhau) hay điều trị kháng sinh phù hợp (là việc sử dụng kháng sinh nhạy cảm với VK gây bệnh theo kháng sinh đồ của kết quả nuôi cấy VK sau đó, đủ liều và khoảng cách giữa các liều phù hợp) <sup>125</sup>.

- Viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy sớm: viêm phổi xuất hiện từ ngày 2- đến ngày thứ 5 nhập viện- thở máy.

- Viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy muộn: viêm phổi xuất hiện từ ngày thứ 5 thở máy trở đi.

- Thời gian thở máy: tính theo đơn vị ngày, từ ngày đặt ống nội khí quản đầu tiên đến khi bỏ được máy thở, BN tự thở được.

- Thời gian nằm khoa hồi sức tích cực: tính theo đơn vị ngày, từ ngày vào điều trị tại khoa HSTC đến khi chuyển khoa khác, khỏi ra viện hoặc tử vong.

- Thời gian nằm viện: tính theo đơn vị ngày, tổng thời gian: từ ngày vào nằm viện điều trị đến khi ra viện hoặc tử vong.

- Tử vong: bao gồm những BN tử vong tại BV và những BN nặng xin về để tử vong tại nhà.

- Tỷ lệ tử vong chung: tử vong do bất cứ nguyên nhân nào xảy ra trong quá trình điều trị tại BV.

- Tỷ lệ tử vong được cho là do viêm phổi gây ra: hội chứng suy hô hấp cấp tiên triển ARDS, sốc nhiễm khuẩn.

- Giá trị chẩn đoán của kỹ thuật multiplex realtime PCR:

**Bảng 2.5.** Diễn giải kết quả tính giá trị chẩn đoán của multiplex realtime PCR

	Nuôi cấy (+)	Nuôi cấy (-)	Tổng
Multiplex realtime PCR (+)	a	b	a + b
Multiplex realtime PCR (-)	c	d	c + d
Tổng	a + c	b + d	

+ Độ nhạy của kỹ thuật (Se): là khả năng multiplex realtime PCR dương tính ở BN có kết quả nuôi cấy dương tính (tỷ lệ dương tính thật):

$$Se = a / (a + c)$$

+ Độ đặc hiệu của kỹ thuật (Sp): là khả năng multiplex realtime PCR âm tính ở BN có kết quả nuôi cấy âm tính (tỷ lệ âm tính thật):

$$Sp = d / (b + d)$$

+ Giá trị chẩn đoán dương tính (PPV): là tỷ lệ BN có kết quả multiplex realtime PCR dương tính thật so với tổng số BN có kết quả multiplex realtime PCR dương tính:

$$PPV = a / (a + b)$$

+ Giá trị chẩn đoán âm tính (NPV): là tỷ lệ BN có multiplex realtime PCR âm tính thật so tổng số BN có kết quả nuôi cấy âm tính:

$$NPV = d / (c + d)$$

❖ *Các chỉ số cận lâm sàng:*

- Xét tế bào máu ngoại vi, tỷ lệ bạch cầu đa nhân trung tính/tỷ lệ bạch cầu lympho, đông máu cơ bản, procancitonin, chức năng gan- thận, điện giải đồ, ure/albumin máu được ghi nhận vào lúc 8 giờ hàng ngày.

- Khí máu động mạch được theo dõi thường quy: pH, tỷ lệ PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, PEEP, chênh áp oxy phế nang- mao mạch A-aDO<sub>2</sub> được ghi nhận 8 giờ hàng ngày.

- XQ ngực và/hoặc CT scanner ngực (nếu có): hình ảnh XQ/ CT ngực ngày vào viện và gần ngày chẩn đoán viêm phổi nhất. Các hình ảnh tổn thương gồm thâm nhiễm, đông đặc, hang.

❖ *Các xét nghiệm vi sinh:*

- Kết quả nuôi cấy định lượng VK với bệnh phẩm là đờm, dịch phế quản, dịch rửa phế quản phế nang và kháng sinh đồ thường quy.

- Kết quả multiplex realtime PCR thực hiện đồng thời cũng trên bệnh phẩm này đối với 5 loại VK gây bệnh thường gặp *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

**2.3.4. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu**

- Mục tiêu nghiên cứu của đề tài là nhằm đề xuất ứng dụng kỹ thuật multiplex realtime PCR trong chẩn đoán sớm căn nguyên vi khuẩn gây bệnh thường gặp, nhằm đem lại định hướng sử dụng kháng sinh cho các bác sỹ lâm sàng nhằm nâng cao hiệu quả trong việc điều trị VPBV, VPLQTM, giảm tỷ lệ tử vong, thời gian thở máy, thời gian nằm viện, giảm chi phí và giảm gánh nặng cho xã hội trong tương lai. Ngoài mục tiêu trên, đề tài không nhằm vào bất cứ mục tiêu nào với lợi ích cá nhân hoặc gây ảnh hưởng không tốt tới cộng đồng và xã hội. Lợi ích của đề tài lớn hơn rủi ro khi tiến hành thực hiện đề tài.

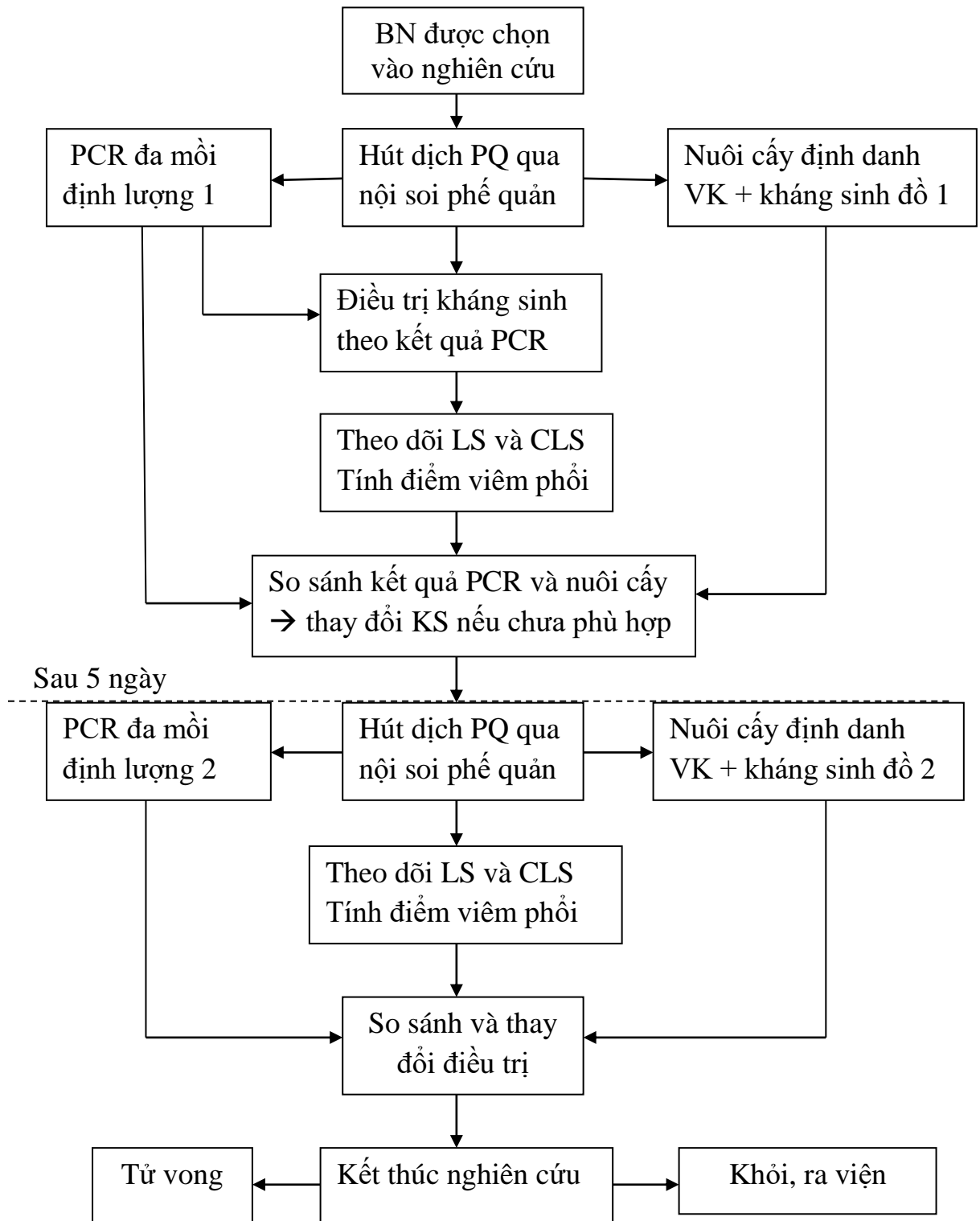


- Các phương pháp và kỹ thuật nghiên cứu được tiến hành trên đối tượng nghiên cứu với sự hợp tác, tự nguyện của người bệnh hoặc gia đình người bệnh trước khi người bệnh tham gia vào nghiên cứu mà không có bất cứ sự ép buộc hay cưỡng chế nào. Đối tượng có thể rút khỏi nghiên cứu mà không bị phân biệt đối xử trong quá trình khám và điều trị tại bệnh viện.

- Cán bộ nghiên cứu phải giải thích về mục tiêu của nghiên cứu, quyền lợi của người tham gia nghiên cứu cho người bệnh hoặc gia đình người bệnh. Mọi thông tin liên quan tới cá nhân đối tượng đều được bảo mật.

- Nghiên cứu này đã được chấp thuận của Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh của Trường Đại học Y Hà nội thông qua (quyết định số: 187/HĐĐĐĐHYHN cấp ngày 20 tháng 02 năm 2016).

## SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU



### CHƯƠNG 3

#### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

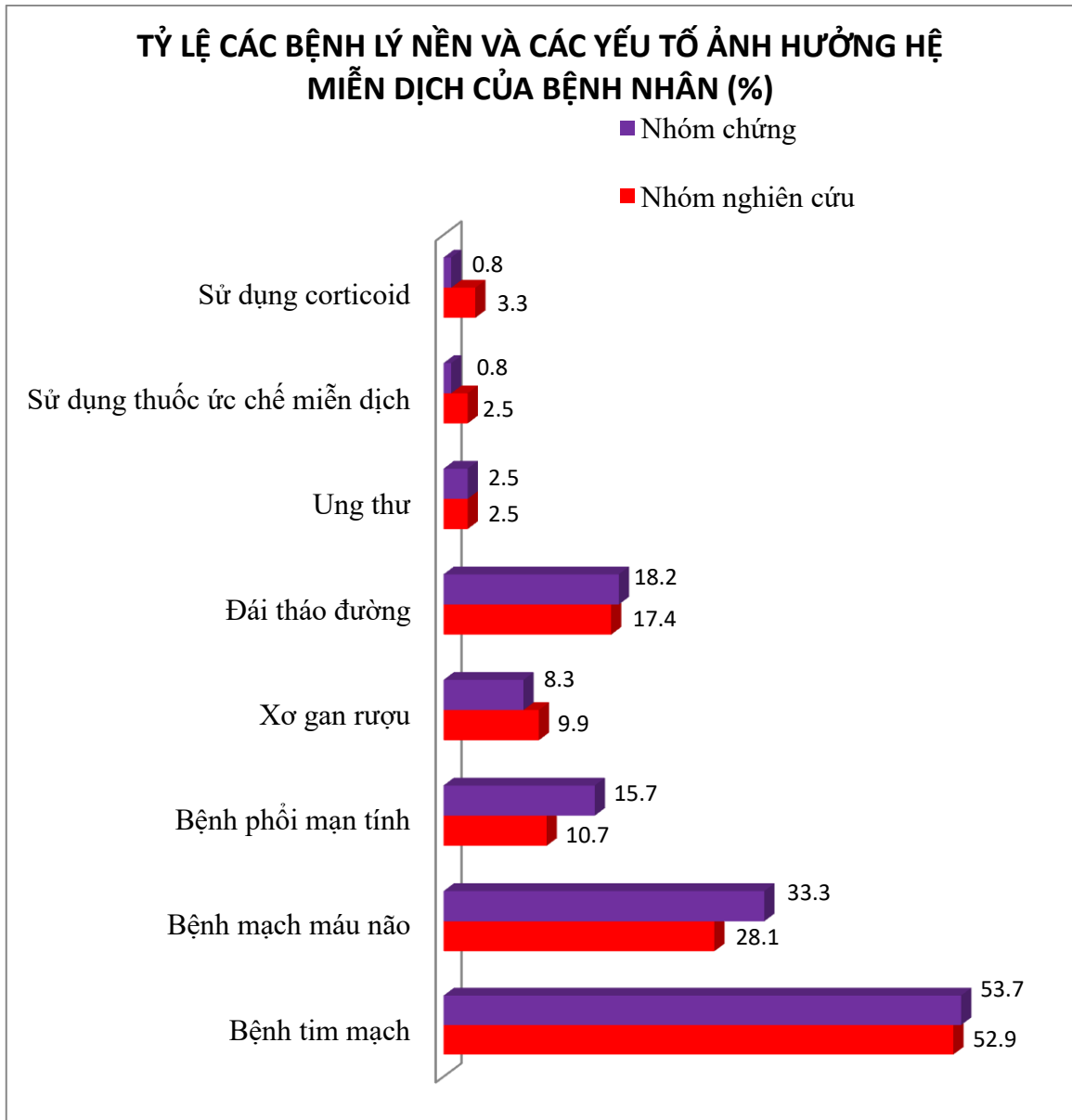
#### 3.1. Đặc điểm chung của hai nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu

##### 3.1.1. Đặc điểm chung lúc nhập viện

**Bảng 3.1.** Đặc điểm chung lúc nhập viện của hai nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu

Đặc điểm		Cả hai nhóm (n= 242) n (%)	Nhóm nghiên cứu (n= 121)* n (%)	Nhóm chứng (n= 121)** n (%)	P (*_**)
Tuổi (Trung bình ± SD) (Nhỏ nhất- Lớn nhất)		67,94 ± 16,59 (16 – 96)	66,33 ± 16,65 (17 – 96)	69,55 ± 16,46 (16 – 95)	0,132
BMI (Trung bình ± SD) (Thấp nhất- cao nhất)		20,58 ± 3,39 (13,70 – 39,0)	21,01 ± 3,57 (14,70 – 39,0)	20,15 ± 3,17 (13,70 – 30,4)	0,06
Giới nam		172 (71,1)	88 (72,7)	84 (69,4)	0,571
Lý do đặt ống nội khí quản	Suy hô hấp	104 (42,4)	57 (47,1)	47 (38,8)	
	RL ý thức	79 (32,2)	33 (27,3)	46 (38,0)	
	CTSN	10 (4,1)	5 (4,1)	5 (4,1)	> 0,05
	Sốc	2 (0,8)	2 (5,0)	0 (0)	
	Ngừng tuần hoàn	4 (1,6)	2 (1,7)	2 (1,7)	
Khoa đặt nội khí quản	Hồi sức tích cực	194 (74,2)	101(83,5)	93 (76,9)	> 0,05
	Cấp cứu	19 (7,6)	5 (4,1)	14 (11,6)	
	Các khoa nội	10 (4,0)	5 (4,1)	5 (4,1)	
	Gây mê hồi sức	9 (3,6)	4 (3,6)	5 (4,1)	
Chẩn đoán	VPBV	5 (2,1)	3 (2,7)	2 (1,7)	
	VPLQTM	237(97,9)	118 (97,3)	119 (98,3)	> 0,05

**Nhận xét:** Tuổi trung bình, tỷ lệ giới nam và chỉ số khối cơ thể BMI không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm nghiên cứu. Lý do chính để đặt nội khí quản chiếm tỷ lệ cao nhất là: suy hô hấp (cả hai nhóm 42,4%) và rối loạn ý thức (cả hai nhóm 32,2%). Tiếp theo là các lý do chấn thương, sốc và ngừng tuần hoàn khi vào viện.



**Biểu đồ 3.1. Phân bố tỷ lệ các bệnh lý đi kèm và các yếu tố ảnh hưởng đến hệ miễn dịch của BN trong nghiên cứu**

**Nhận xét:** Chiếm tỷ lệ cao nhất là nhóm bệnh tim mạch, tiếp theo là nhóm các bệnh mạch máu não, bệnh đái tháo đường, nhóm bệnh phổi mạn tính, bệnh xơ gan rượu, còn lại là các bệnh lý ung thư, suy giảm miễn dịch, sử dụng corticoid toàn thân.

**3.1.2. Một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng thời điểm chẩn đoán viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy**

**Bảng 3.2.** Một số đặc điểm lâm sàng

Đặc điểm		Cả hai nhóm (n = 242) n (%)	Nhóm nghiên cứu (n= 121) * n (%)	Nhóm chứng (n= 121) ** n (%)	p (*-**)
Điểm Glasgow	< 7	12 (5,0%)	7 (6,8%)	5 (4,7%)	0,755
	7- 10	58 (24,0%)	27 (26,2%)	31 (29,0%)	
Đặc điểm dịch phế quản	Ít	108 (44,6%)	53 (43,8%)	55 (45,5%)	> 0,05
	Nhiều	115 (47,5%)	60 (49,5%)	55 (45,5%)	
	Đục mủ	4 (1,7%)	0 (0,0%)	4 (3,3%)	
	Không rõ	15 (6,2%)	8 (6,6%)	7 (5,8%)	
Nhiệt độ	$\geq 38^0$	43 (17,8%)	21 (17,4%)	22 (18,2%)	0,866
	$< 36^0$	0	0	0	
VPLQTM muộn		126 (52,1%)	64 (52,9%)	62 (51,2%)	0,797
Sốc nhiễm khuẩn		75 (31,0%)	31 (25,6%)	44 (36,4%)	0,071

**Nhận xét:** Không có sự khác biệt về các triệu chứng lâm sàng lúc chẩn đoán VPBV, VPLQTM về điểm Glasgow, tăng tiết dịch phế quản hoặc dịch phế quản mủ, nhiệt độ, tỷ lệ VPLQTM muộn và tình trạng sốc nhiễm khuẩn giữa hai nhóm bệnh nhân nghiên cứu.

**Bảng 3.3.** Một số đặc điểm xét nghiệm máu

Đặc điểm		Cả hai nhóm (n = 242) n (%)	Nhóm nghiên cứu (n= 121) * n (%)	Nhóm chứng (n= 121) ** n (%)	P (*-***)
Số lượng bạch cầu (G/l)	Trung bình ± SD	15,26 ± 7,27	16,03 ± 8,04	14,49 ± 6,38	0,204
	< 4	2 (0,8)	1 (1,4)	1 (1,4)	
	> 12	88 (36,4)	47 (65,3)	41 (56,9)	
Tỷ lệ BCTT/LP (Trung bình ± SD)		23,49 ± 33,09	21,86 ± 32,62	25,08 ± 33,59	0,458
Nồng độ ure máu (mmol/l) (Trung bình ± SD)		12,33 ± 8,61	11,23 ± 6,57	13,48 ± 10,22	0,053
Nồng độ albumin máu (g/l) (Trung bình ± SD)		26,68 ± 4,67	25,38 ± 4,45	28,11 ± 4,49	<0,00 1
Tỷ lệ nồng độ ure/ albumin máu (Trung bình ± SD)		0,49 ± 0,42	0,58 ± 0,51	0,41 ± 0,25	0,004
Nồng độ procancitonil máu (ng/ml)	2- 10	28 (11,6)	16 (28,6)	12 (20,7)	0,322
	> 10	29 (12,0)	16 (28,6)	13 (22,4)	
Nồng độ lactat máu (mmol/ml)	2,2- 4	41 (22,2)	17 (18,9)	24 (25,3)	0,351
	> 4	16 (8,6)	10 (11,1)	6 (6,3)	

**Nhận xét:** Tất cả các thông số xét nghiệm để phục vụ cho chẩn đoán VPLQTM như: Số lượng bạch cầu trung bình đều cao ở cả hai nhóm, nồng độ procancitonil máu, nồng độ lactat máu khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm nghiên cứu với  $p > 0,05$ . Riêng nồng độ albumin máu và tỷ lệ ure/albumin máu có sự khác biệt giữa hai nhóm nghiên cứu với  $p < 0,05$ .

**Bảng 3.4.** Đặc điểm khí máu động mạch

Kết quả khí máu động mạch		Cả hai nhóm (n = 242) n (%)	Nhóm nghiên cứu (n= 121) * n (%)	Nhóm chứng (n= 121) ** n (%)	p (*_**)
pH	≤ 7,15	5 (2,5)	3 (3,2)	2 (1,9)	> 0,05
	< 7,20	40 (16,5)	12 (9,9)	28 (23,1)	
	< 7,35	45 (22,8)	15 (16,0)	30 (29,1)	
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	≤ 240	85 (45,0)	40 (42,6)	45 (47,4)	0,506
	< 200	56 (29,6)	24 (25,5)	32 (33,7)	0,220
	< 100	8 (4,2)	3 (3,2)	5 (5,3)	
PO <sub>2</sub> < 60mmHg		13 (7,0)	8 (8,2)	5 (5,7)	0,508
A-aDO <sub>2</sub> (mmHg)	Trung bình ± SD	157,17 ± 103,21	151,04 ± 95,20	163,30 ± 110,85	0,430
	≥ 50	162 (91,0)	84 (94,4)	78 (87,6%)	0,116
	> 100	131 (73,6)	63 (70,8)	68 (76,4)	0,395

**Nhận xét:** Khí máu động mạch thời điểm chẩn đoán VPBV, VPLQTM giữa hai nhóm không khác biệt có ý nghĩa thống kê  $p > 0,05$ .

**Bảng 3.5.** Tổn thương trên phim XQ ngực- cắt lớp vi tính ngực

Đặc điểm		Cả hai nhóm (n = 242) n (%)	Nhóm nghiên cứu (n= 121) * n (%)	Nhóm chứng (n= 121) ** n (%)	p (*-**)
Tổn thương trên XQ ngực		114 (47,1)	52 (43,0)	62 (51,2)	0,198
Tổn thương trên phim cắt lớp vi tính ngực	Thâm nhiễm	115 (47,5)	70 (57,9)	45 (37,2)	0,001
	Hang	2 (0,8)	1 (0,8)	1 (0,8)	
	TT phối hợp	115 (47,5)	70 (57,9)	45 (37,2)	0,001
	Không rõ	127 (52,5)	51 (42,1)	76 (62,8)	
Vị trí tổn thương	Thùy trên phải	42 (17,4)	24 (19,8)	18 (14,9)	0,962
	Thùy giữa phải	28 (11,6)	15 (12,4)	13 (10,7)	0,643
	Thùy dưới phải	65 (26,9)	41 (33,9)	24 (19,8)	0,211
	Cả phổi phải	87 (36,0)	51 (42,1)	36 (29,8)	0,044
	Thùy trên trái	40 (16,5)	25 (20,7)	15 (12,4)	0,445
	Thùy dưới trái	58 (24,0)	37 (30,6)	21 (17,4)	0,203
	Cả phổi trái	77 (31,8)	46 (38,0)	31 (25,6)	0,038
	Cả hai phổi	63 (26,0)	38 (31,4)	25 (20,7)	0,057

**Nhận xét:** Chủ yếu xuất hiện trên phim cắt lớp vi tính ngực là tổn thương thâm nhiễm và tổn thương phối hợp, đây là hai tổn thương chiếm tỷ lệ cao nhất trong nghiên cứu, gần như không gặp tổn thương dạng hang . Vị trí tổn thương thường gặp ở cả phổi phải hoặc cả phổi trái.

Về kiểu và vị trí tổn thương trên phim không có sự khác biệt rõ rệt giữa hai nhóm với  $p > 0,05$ .

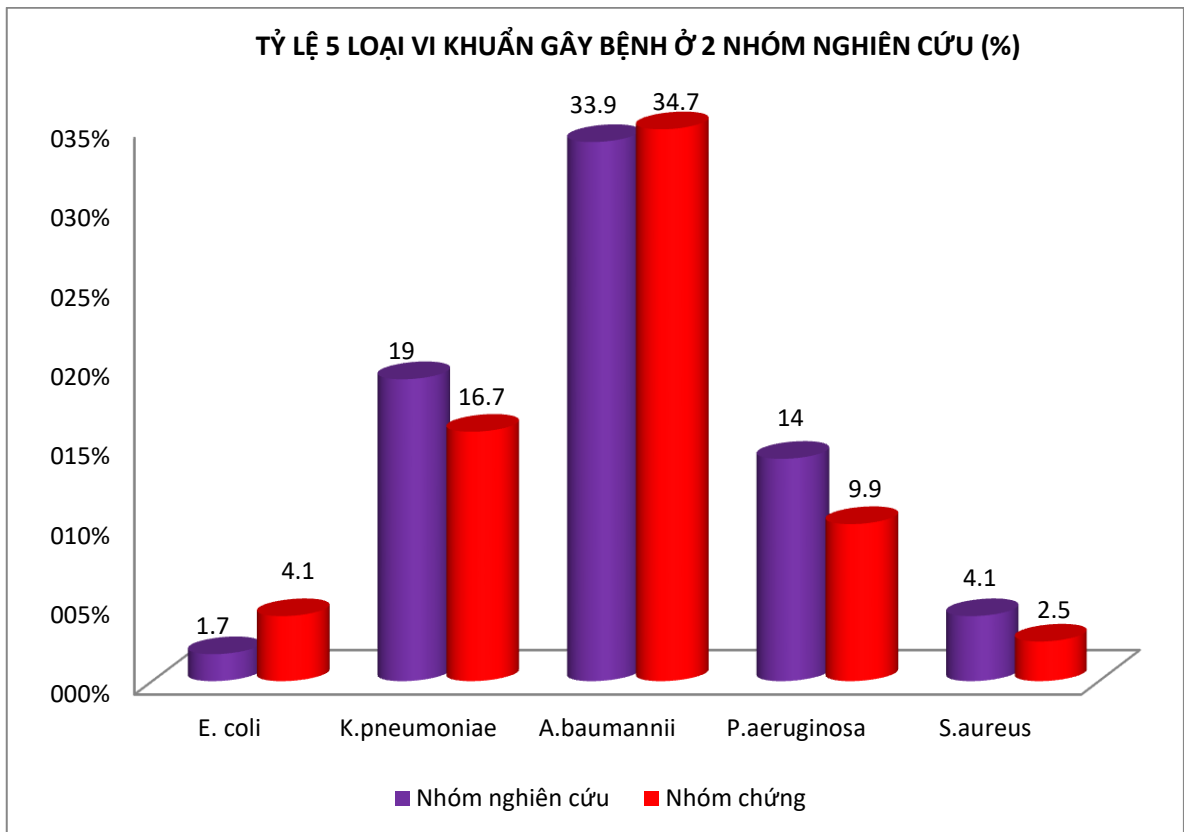


**Bảng 3.6.** Kết quả nuôi cấy vi sinh bệnh phẩm đường hô hấp của bệnh nhân trong nghiên cứu

Loại vi khuẩn	Cả hai nhóm n= 242	Nhóm nghiên cứu (*) n= 121	Nhóm chứng (**) n= 121	p (*-**)
<i>E. coli</i>	7 (2,9%)	2 (1,7%)	5 (4,1%)	0,446
<i>K. pneumoniae</i>	42 (17,4%)	23 (19,0%)	19 (15,7%)	0,497
<i>A. baumannii</i>	83 (34,3%)	41 (33,9%)	42 (34,7%)	0,892
<i>P. aeruginosa</i>	29 (12,0%)	17 (14,0%)	12 (9,9%)	0,322
<i>S. aureus</i>	8 (3,3%)	5 (4,1%)	3 (2,5%)	0,722
<i>S. marcessens</i>	5 (2,1%)	1 (0,8%)	4 (3,3%)	0,370
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (0,4%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)	
<i>Nấm candidas</i>	17 (7,0%)	7 (5,8%)	10 (8,3%)	0,450
<i>Khác</i>	13 (5,4%)	6 (5,0%)	7 (5,8%)	0,776

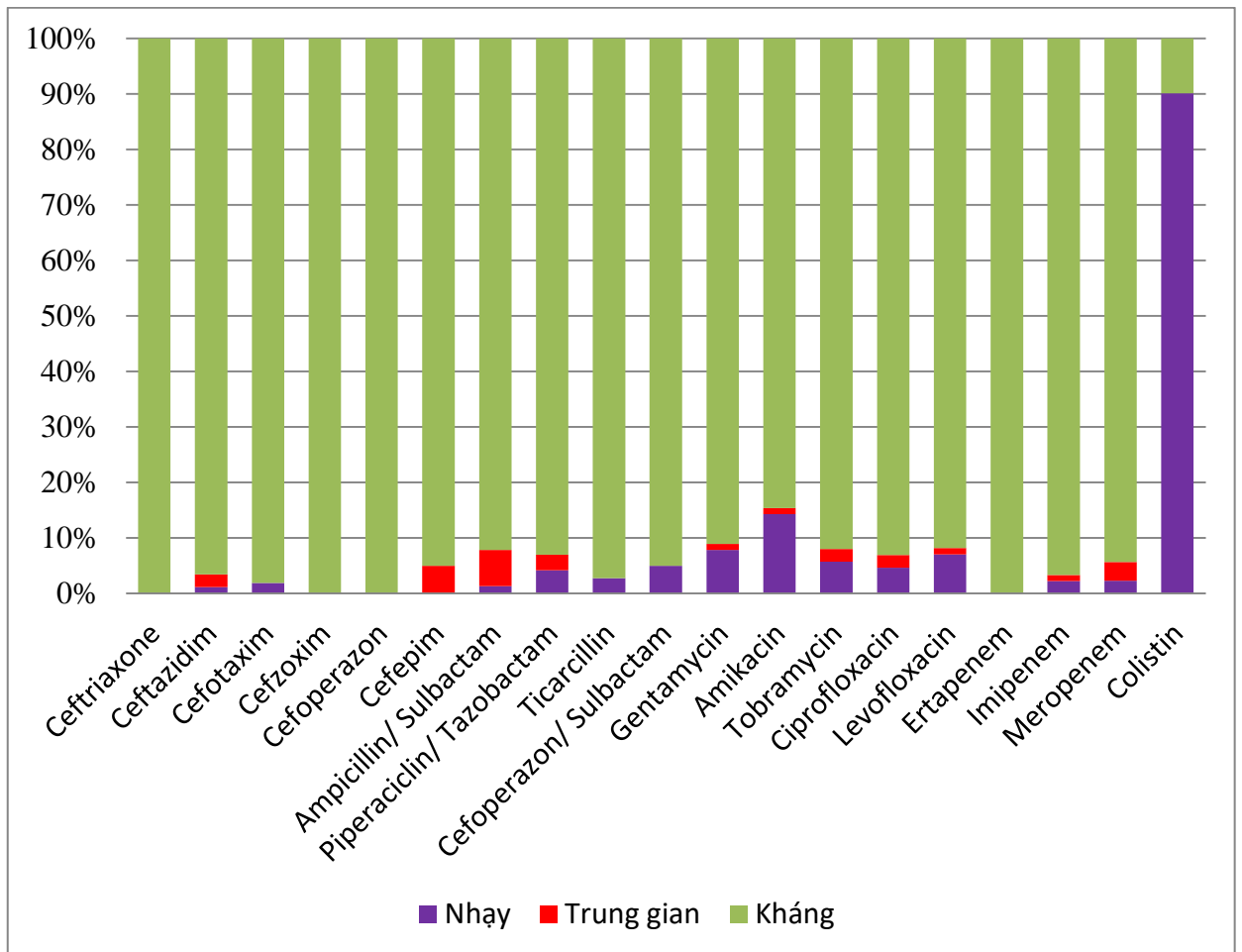
**Nhận xét:** Chiếm tỷ lệ cao nhất gây viêm phổi vẫn là nhóm 5 vi khuẩn lần lượt theo thứ tự *Acinetorbacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Ngoài ra chiếm một phần nhỏ là các vi khuẩn khác, nấm.

Kết quả nuôi cấy vi khuẩn giữa hai nhóm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm.



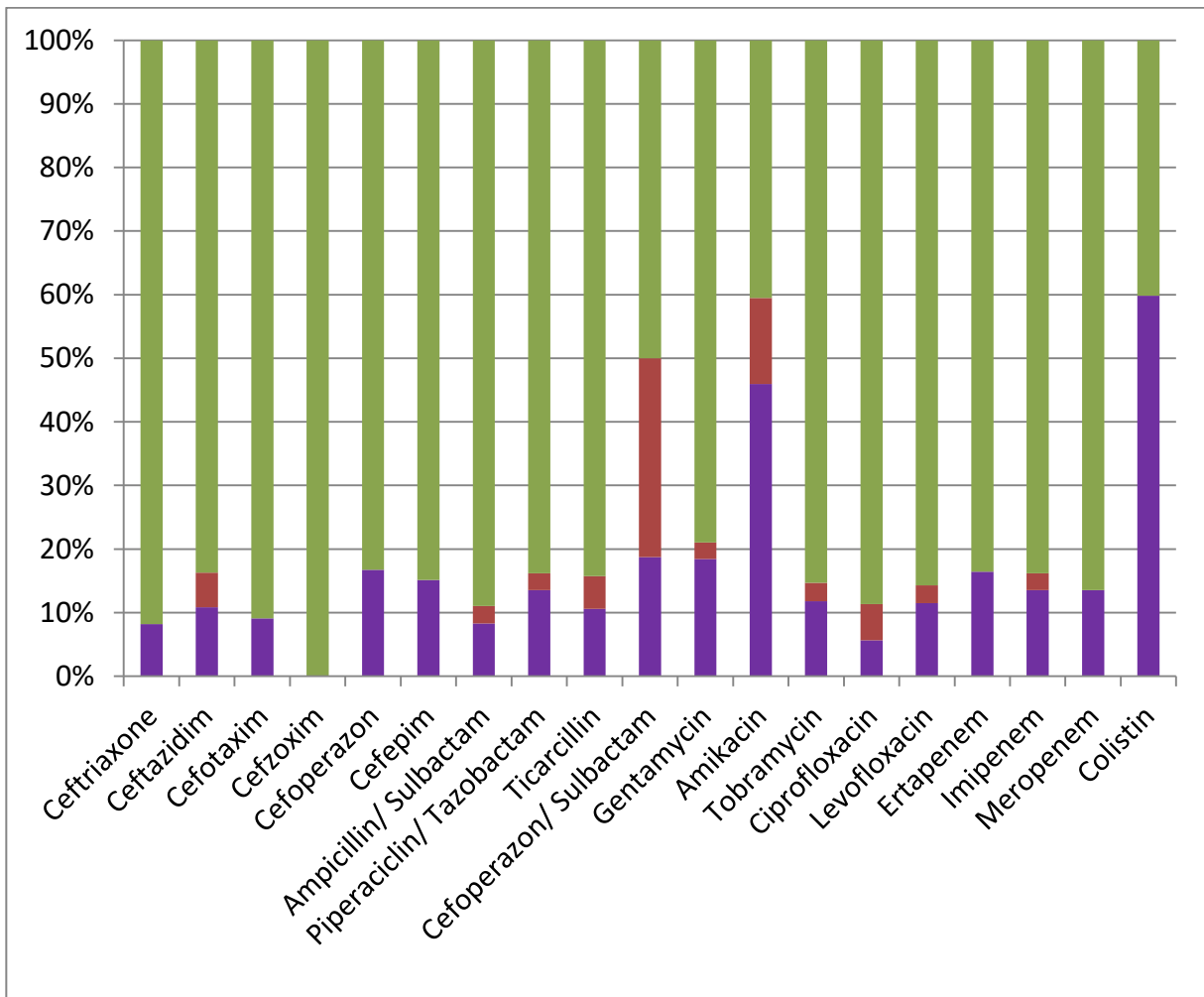
***Biểu đồ 3.2. Tỷ lệ phân bố kết quả nuôi cấy 5 loại vi khuẩn ở 2 nhóm nghiên cứu***

**Nhận xét:** So sánh kết quả nuôi cấy dịch phế quản về 5 loại VK trong nghiên cứu cho thấy có sự tương đồng giữa hai nhóm, chiếm tỷ lệ cao nhất cũng vẫn là *Acinetobacter baumannii*, tiếp theo *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, cuối cùng là *Escherichia coli* và *Staphylococcus aureus*.



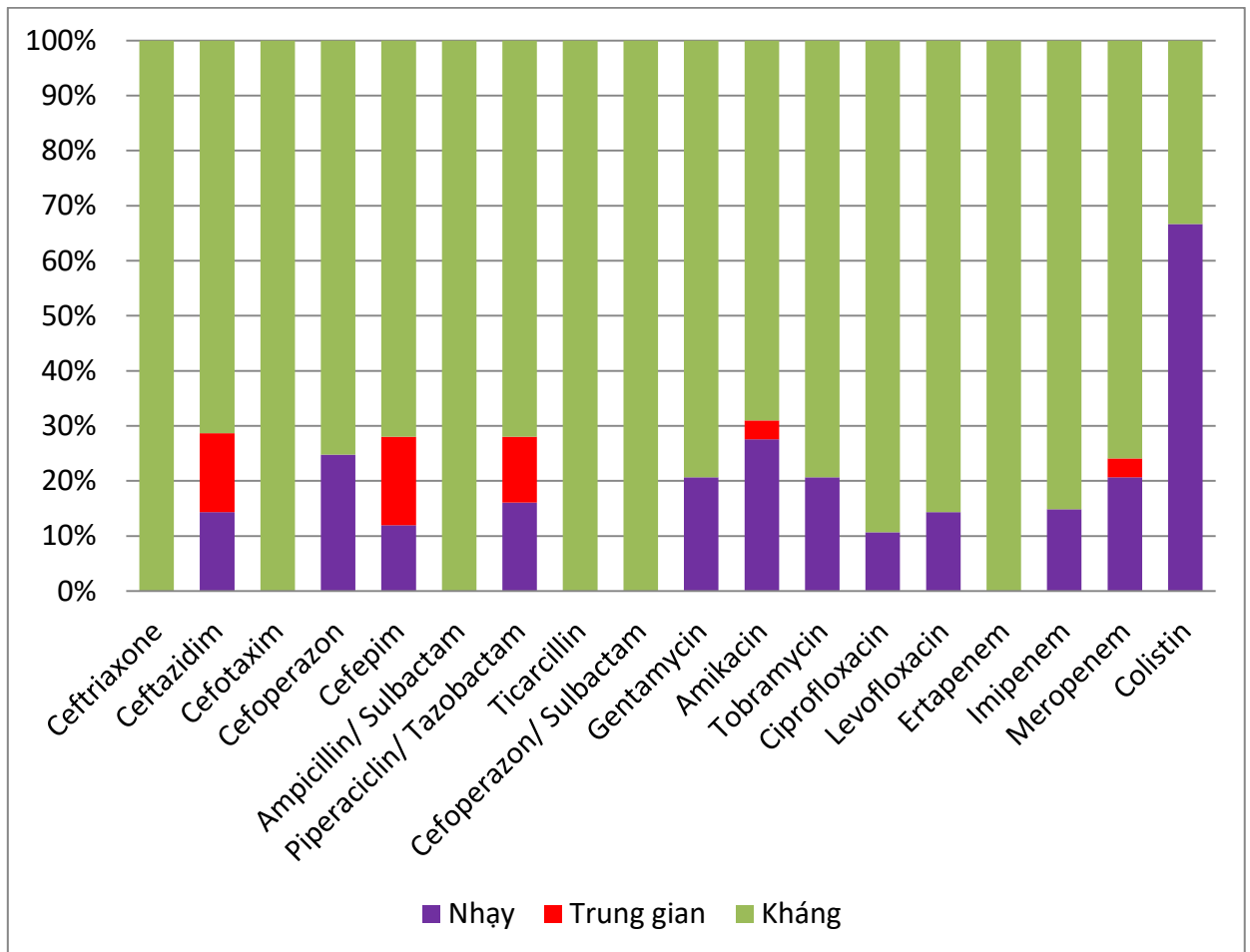
**Biểu đồ 3.3. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của *Acinetobacter baumannii* (n=104)**

**Nhận xét:** *Acinetobacter baumannii* đề kháng 100% với một số kháng sinh nhóm cephalosporin (ceftriaxone, cefzoxim, cefoperazon), đề kháng trên 80% với kháng sinh nhóm piperacillin + tazobactam, quinolon, macrolid đặc biệt cả với nhóm kháng sinh được coi là vũ khí cuối cùng carbapenem. Riêng với colistin đã bị kháng khoảng 10%.



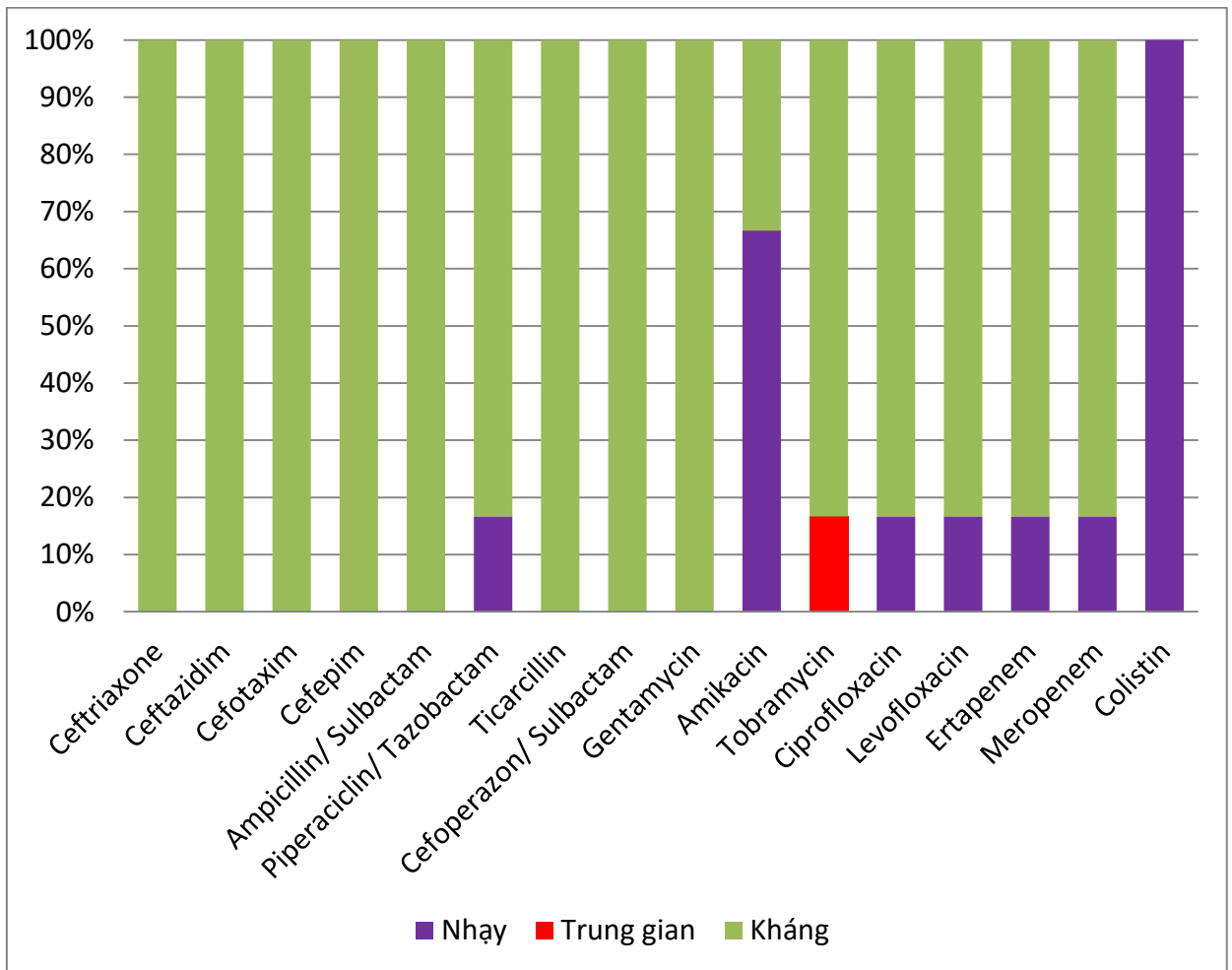
**Biểu đồ 3.4. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của *Klebsiella pneumoniae* (n= 48)**

**Nhận xét:** Trong nghiên cứu này *Klebsiella pneumoniae* còn nhạy cảm với một số cephalosporin, nhóm quinolon, kể cả với carbapenem tỷ lệ nhạy cảm chiếm khoảng dưới 20%. Tuy nhiên, riêng với colistin, *Klebsiella pneumoniae* đã kháng tới 40%.



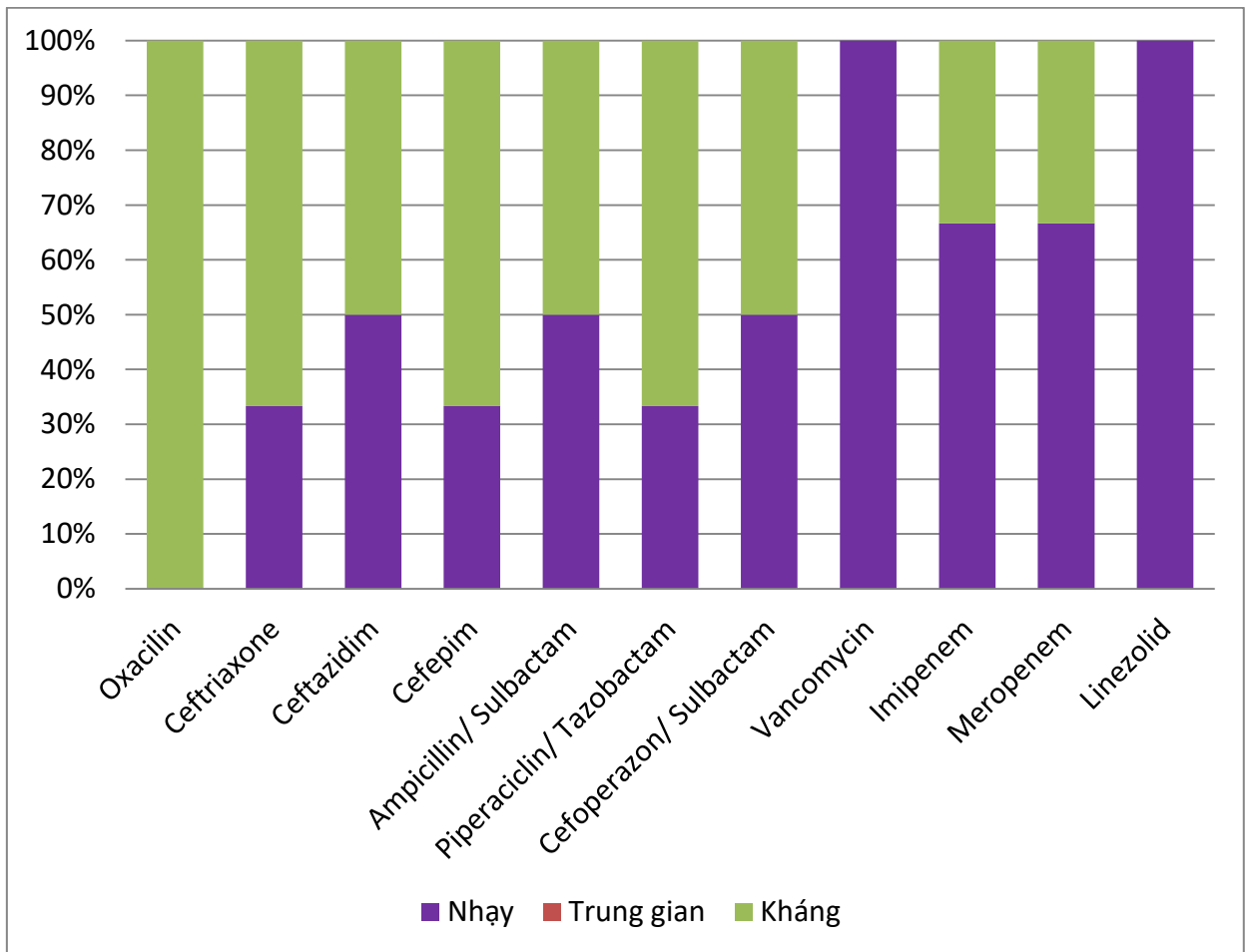
**Biểu đồ 3.5. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của *Pseudomonas aeruginosa***  
(*n* = 39)

**Nhận xét:** *Pseudomonas aeruginosa* đề kháng cao nhất 100% với ceftriaxon, cefotaxim và cefoperazon + sulbactam, ertapenem. Còn nhạy cảm khoảng dưới 30% với kháng sinh macrolid, carbapenem. Đối với colistin, *Pseudomonas aeruginosa* chỉ còn nhạy cảm 60- 70%.



**Biểu đồ 3.6. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của *Escherichia coli* (n= 7)**

**Nhận xét:** *Escherichia coli* kháng 100% với kháng sinh nhóm cephalosporin, còn nhạy cảm một phần với amikacin, nhóm carbapenem và 100% nhạy với colistin.



**Biểu đồ 3.7. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của *Staphylococcus aureus* (n= 8)**

**Nhận xét:** *Staphylococcus aureus* kháng 100% với methicillin. Nhạy cảm 100% với vancomycin và linezolid.

### 3.1.3. Các yếu tố liên quan đến tỷ lệ tử vong trong nghiên cứu

**Bảng 3.7.** Phân tích các yếu tố liên quan đến tỷ lệ tử vong ở cả hai nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu

Yếu tố	Tử vong n= 101	Sống n= 141	Liên quan đơn biến p OR (95%CI)	Liên quan đa biến p OR (95%CI)
Tuổi $\geq 65$	72	77	0,033 1,782(1,04 – 3,04)	0,425 1,387 (0,621- 3,097)
Sốc nhiễm khuẩn	51	24	< 0,001 4,571 (2,55 – 8,20)	0,049 1,687 (0,687- 4,142)
Sử dụng ks không phù hợp	49	39	0,004 2,187(1,28 – 3,74)	0,035 0,437 (0,203- 0,943)
pH $\leq 7,15$	5	0	0,012	0,716 1,282(0,336- 4,819)
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> < 200	32	24	0,007 2,361 (1,25 – 4,46)	0,836 1,087 (0,439- 2,394)
YTNC nhiễm VK đa kháng	91	81	< 0,001 4,926 (2,51 – 9,65)	0,108 0,421 (0,146- 1,208)
Thời gian nằm viện $\geq 10$ ngày	65	116	< 0,001 0,316 (0,17 – 0,58)	0,475 0,750 (0,340- 1,652)
Tỷ lệ nồng độ ure/albumin máu (Trung bình $\pm$ SD)	0,61 $\pm$ 0,38	0,41 $\pm$ 0,42	0,001	
Nồng độ ure máu (mmol/l)	14,29 $\pm$ 8,59	10,92 $\pm$ 8,38	0,004	
Nồng độ albumin máu (g/l)	24,48 $\pm$ 3,98	28,32 $\pm$ 4,47	< 0,001	

**Nhận xét:** Ở cả hai nhóm nghiên cứu, với phân tích đơn biến, các yếu tố như tuổi  $\geq 65$ , có tình trạng sốc nhiễm khuẩn ngay khi chẩn đoán VPBV, VPLQTM, sử dụng kháng sinh không phù hợp, có yếu tố nhiễm vi khuẩn đa kháng, thời



gian nằm viện  $\geq 10$  ngày, nồng độ albumin máu là những yếu tố dự báo nguy cơ độc lập liên quan TLTV trong ở BN VPBV, VPLQTM có ý nghĩa với  $p < 0,05$ . Với phân tích đa biến, chỉ có sốc nhiễm khuẩn và sử dụng kháng sinh không phù hợp là hai yếu tố độc lập liên quan TLTV có ý nghĩa với  $p < 0,05$ .

**Bảng 3.8.** Phân tích các yếu tố liên quan đến tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân nhóm nghiên cứu

Yếu tố	Tử vong n= 42	Sống n= 79	Liên quan đơn biến P OR (95%CI)	Liên quan đa biến p OR (95%CI)
Tuổi $\geq 65$	24	42	0,081 2,048 (0,91 – 4,62)	0,356 1,945 (0,474 - 7,980)
Sốc nhiễm khuẩn	17	14	< 0,001 4,538(1,90 – 10,83)	0,994 0,995 (0,227 – 4,362)
Sử dụng ks không phù hợp	13	16	0,044 2,332 (0,98 – 5,58)	0,047 0,229 (0,054 – 0,979)
pH $\leq 7,15$	3	0	0,027	0,270 1,806 (0,405- 8,068)
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> < 200	12	12	0,012 3,375 (1,27 – 8,95)	0,438 1,806 (0,405 -8,068)
Có YTNC nhiễm VK đa kháng	50	32	0,001 5,60 (1,82 – 17,26)	0,563 0,563 (0,080- 3,945)
Thời gian nằm viện $\geq 10$ ngày	25	76	0,007 0,269 (0,1 – 0,72)	0,270 6,114 (0,245- 152,691)
Tỷ lệ nồng độ ure/albumin máu (Trung bình $\pm$ SD)	0,58 $\pm$ 0,31	0,34 $\pm$ 0,19	0,001	
Nồng độ ure máu (mmol/l)	14,44 $\pm$ 7,98	9,90 $\pm$ 5,41	0,004	
Nồng độ albumin máu (g/l)	25,97 $\pm$ 2,85	28,92 $\pm$ 4,75	<0,001	

**Nhận xét:** Ở nhóm nghiên cứu, giống bảng phân tích cả hai nhóm, khi phân tích đơn biến, các yếu tố như: có tình trạng sốc nhiễm khuẩn, sử dụng kháng sinh không phù hợp, có yếu tố nhiễm vi khuẩn đa kháng, thời gian nằm viện  $\geq 10$  ngày, nồng độ albumin máu là những yếu tố dự báo nguy cơ độc lập liên quan tỷ lệ tử vong trong ở bệnh nhân VPLQTM có ý nghĩa với  $p < 0,05$ .

Với phân tích đa biến, chỉ có sử dụng kháng sinh không phù hợp là yếu tố duy nhất độc lập liên quan tỷ lệ tử vong có ý nghĩa với  $p < 0,05$ . Các yếu tố khác như tuổi  $\geq 65$ , sốc nhiễm khuẩn, có yếu tố nhiễm vi khuẩn đa kháng, nồng độ albumin máu lại không phải là yếu tố dự báo nguy cơ tử vong có ý nghĩa với  $p > 0,05$ .

**Bảng 3.9.** Phân tích các yếu tố liên quan đến tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân nhóm chứng

Yếu tố	Tử vong n= 59	Sống n= 59	Liên quan đơn biến p OR (95%CI)	Liên quan đa biến p OR (95%CI)
Tuổi $\geq 65$	48	35	0,593 1,234 (0,57 – 2,67)	0,817 0,883 (0,308 – 2,532)
Sốc nhiễm khuẩn	34	10	< 0,001 4,30 (1,86 – 9,92)	0,152 2,485 (0,715- 8,642)
Sử dụng ks không phù hợp	36	23	0,035 1,414 (0,68 – 2,94)	0,040 0,645 (0,232- 1,792)
pH $\leq 7,15$	2	0	>0,05	0,661 0,625 (0,102- 3,815)
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> < 200	20	12	0,279 1,615 (0,68 – 3,85)	0,606 0,758 (0,265- 2,172)
Có YTNC nhiễm VK đa kháng	59	31	<0,001 4,652 (1,91 – 11,32)	0,107 0,291 (0,065 – 1,305)
Thời gian nằm viện $\geq 10$ ngày	40	40	0,055 0,464 (0,21 – 1,02)	0,833 0,893(0,312 – 2,556)
Tỷ lệ nồng độ ure/albumin máu (Trung bình $\pm$ SD)	0,63 $\pm$ 0,41	0,53 $\pm$ 0,62	0,355	
Nồng độ ure máu (mmol/l)	14,21 $\pm$ 8,98	12,59 $\pm$ 11,59	0,413	
Nồng độ albumin máu (g/l)	23,81 $\pm$ 4,25	27,41 $\pm$ 3,89	< 0,001	

**Nhận xét:** Ở nhóm chứng, khi phân tích đơn biến, chỉ còn các yếu tố như: có tình trạng sốc nhiễm khuẩn, sử dụng kháng sinh không phù hợp, có yếu tố nhiễm vi khuẩn đa kháng, nồng độ albumin máu là những yếu tố dự báo nguy

cơ độc lập liên quan tỷ lệ tử vong trong ở bệnh nhân VPLQTM có ý nghĩa với  $p < 0,05$ .

Còn lại các yếu tố như tuổi  $\geq 65$  tuổi, thời gian nằm viện  $\geq 10$  ngày, pH  $\leq 7,15$ , PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>  $< 200$  không phải là các yếu tố dự báo nguy cơ tử vong với  $p > 0,05$ .

### 3.2. Giá trị multiplex realtime PCR trong chẩn đoán viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy

**Bảng 3.10.** So sánh khả năng phát hiện 5 loại vi khuẩn giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy

Kết quả xét nghiệm		Nuôi cấy			Multiplex realtime PCR			P
		n (%)			n (%)			
		Lần 1 n= 121	Lần 2 n= 28	Chung n= 149	Lần 1 n= 121	Lần 2 n= 28	Chung n= 149	
Dương tính		73 (60,3)	19 (67,9)	92 (61,7)	106 (87,6)	27 (92,9)	133 (89,3)	<0,001
Dương tính	1 loại VK	59 (48,8)	14 (50,0)	73 (49,9)	40 (33,1)	7 (25,0)	47 (31,5)	<0,001
	2 loại VK	13 (10,7)	5 (17,9)	18 (12,1)	49 (38,8)	14 (50,0)	63 (40,9)	
	3 loại VK	1 (0,8)	0	1 (0,7)	17 (14,0)	6 (21,4)	23 (15,4)	
Thời gian trả kết quả (Trung bình $\pm$ SD) (giờ)		52,82 $\pm$ 11,70			8,20 $\pm$ 3,37			<0,001

**Nhận xét:** Multiplex realtime PCR có khả năng phát hiện vi khuẩn cao hơn nuôi cấy thường quy ở cả hai lần thực hiện kỹ thuật và có ý nghĩa thống kê  $p <$

0,001; cả multiplex realtime PCR và nuôi cấy đều có khả năng phát hiện nhiều loại vi khuẩn trong cùng một mẫu bệnh phẩm nhưng multiplex realtime PCR có phân cao hơn. Thời gian trả kết quả của multiplex realtime PCR thấp hơn rõ rệt so nuôi cấy với  $p < 0,001$ .

**Bảng 3.11.** So sánh tỷ lệ phát hiện một loại vi khuẩn giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy

Kết quả xét nghiệm	Nuôi cấy n (%)			Multiplex realtime PCR n (%)		
	Lần 1 n= 121	Lần 2 n= 28	Chung n= 149	Lần 1 n= 121	Lần 2 n= 28	Chung n= 149
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	2 (1,7)	0	2 (1,3)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	33 (27,3)	9 (32,1)	42 (28,2)	23 (19,0)	5 (17,9)	27 (18,1)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	14 (11,6)	4 (14,3)	18 (12,1)	6 (5,0)	2 (7,3)	8 (5,4)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8 (6,6)	1 (3,6)	9 (6,1)	5 (4,1)	0	5 (3,4)
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 (3,3)	0	4 (2,7)	4 (3,3)	0	4 (2,7)
Tổng	59 (48,8)	14 (50,0)	73 (49,0)	40 (33,1)	7 (25,0)	47 (31,5)

**Nhận xét:** Multiplex realtime PCR phát hiện 1 loại vi khuẩn thấp hơn so với nuôi cấy thường quy.

**Bảng 3.12.** So sánh tỷ lệ phát hiện hai loại vi khuẩn giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy

Kết quả xét nghiệm	Nuôi cấy n (%)			Multiplex realtime PCR n (%)		
	Lần 1 n= 121	Lần 2 n= 28	Chung n= 149	Lần 1 n= 121	Lần 2 n= 28	Chung n= 149
<i>A. baumannii</i> + <i>K. pneumonia</i>	4 (3,3)	0	4 (2,7)	22	8	30
<i>A. baumannii</i> + <i>E.coli</i>	3 (2,5)	0	3 (2,0)	1 (0,8)	0	1 (1,0)
<i>A. baumannii</i> + <i>P. aeruginosa</i>	3 (2,5)	4 (14,3)	7 (4,7)	5 (4,1)	3 (1,1)	8 (5,4)
<i>A. baumannii</i> + <i>S.aureus</i>	0	0	0	10 (8,3)	2 (7,3)	12 (8,1)
<i>K.pneumonia</i> + <i>P.aeruginosa</i>	3 (2,5)	1 (3,6)	4 (2,7)	3 (2,5)	1 (3,6)	4 (2,7)
<i>K.pneumonia</i> + <i>E.coli</i>	0	0	0	3 (2,5)	0	3 (2,0)
<i>K. pneumonia</i> + <i>S.aureus</i>	1 (0,8)	0	1 (1,0)	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> + <i>E.coli</i>	0	0	0	3 (2,5)	0	3 (2,0)
<i>P.aeruginosa</i> + <i>S.aureus</i>	0	0	0	2 (1,6)	0	2 (1,3)
Tổng	13 (10,7)	5 (17,9)	18 (12,1)	49 (40,5)	14 (50,0)	63 (42,3)

**Nhận xét:** Để phát hiện 2 vi khuẩn trong cùng một mẫu bệnh phẩm thì multiplex realtime PCR có khả năng phát hiện cao hơn hẳn nuôi cấy

**Bảng 3.13.** So sánh tỷ lệ phát hiện ba loại vi khuẩn giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy

Kết quả xét nghiệm	Nuôi cấy n (%)			Multiplex realtime PCR n (%)		
	Lần 1 n= 121	Lần 2 n= 28	Chung n= 149	Lần 1 n= 121	Lần 2 n= 28	Chung n= 149
<i>A. baumannii</i> + <i>K.pneumonia</i> + <i>P.aeruginosa</i>	1 (0,8)	0	1 (1,0)	3 (2,5)	1 (3,6)	4 (2,7)
<i>A. baumannii</i> + <i>K.pneumonia</i> + <i>E.coli</i>	0	0	0	1 (0,8)	3 (10,7)	4 (2,7)
<i>A.baumannii</i> + <i>K.pneumonia</i> + <i>S.aureus</i>	0	0	0	2 (1,7)	0	2 (1,3)
<i>A.baumannii</i> + <i>P.aeruginosa</i> + <i>E.coli</i>	0	0	0	5 (4,1)	1 (3,6)	6 (4,0)
<i>A.baumannii</i> + <i>P.aeruginosa</i> + <i>S.aureus</i>	0	0	0	2 (1,7)	1 (3,6)	3 (2,0)
<i>K.pneumonia</i> + <i>P.aeruginosa</i> + <i>S.aureus</i>	0	0	0	3 (2,5)	0	3 (2,0)
Tổng	1 (0,8)	0	1 (1,0)	17 (14,0)	6 (21,4)	22 (14,8)

**Nhận xét:** Khả năng phát hiện 3 vi khuẩn trong cùng một mẫu bệnh phẩm thì kỹ thuật multiplex realtime PCR cũng phát hiện cao hơn nuôi cấy.

**Bảng 3.14.** Sự phù hợp kết quả giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy đối với 5 loại vi khuẩn

Tên vi khuẩn	Nuôi cấy (+)	Multiplex realtime PCR (+)					Multiplex realtime PCR (-)
		<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Ac</i>	<i>Pa</i>	<i>Sa</i>	
<i>Ec</i> (n= 2)	2	2	0	0	0	0	0
<i>Kp</i> (n= 28)	28	0	25	3	0	0	0
<i>BN 62</i>				1			0
<i>BN 63</i>				1			0
<i>BN 149</i>				1			0
<i>Ac</i> (n= 54)	54	0	0	52	0	0	2
<i>BN 49</i>							1
<i>BN 58</i>							1
<i>Pa</i> (n= 23)	23	0	0	0	23	0	0
<i>Sa</i> (n= 5)	5	0	0	0	0	5	0

**Nhận xét:** Trong 28 bệnh nhân có kết quả nuôi cấy là *Klebsiella pneumoniae* thì có 03 bệnh nhân cho kết quả multiplex realtime PCR là *Acinetobacter baumannii*; 54 bệnh nhân có kết quả nuôi cấy là *Acinetobacter baumannii* thì có 02 bệnh nhân có kết quả multiplex realtime PCR âm tính. Còn lại *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Staphylococcus aureus* có kết quả nuôi cấy và multiplex realtime PCR trùng nhau.

**Bảng 3.15.** Giá trị chẩn đoán của multiplex realtime PCR đối với từng loại vi khuẩn

	TP (n)	TN (n)	FP (n)	FN (n)	Se	Sp	PPV	NPV	LR (+)	LR (-)	Kappa index
<i>Ec</i>	7	106	36	0	100,0	74,6	16,3	100,0	3,9	0	0,607 (p= 0,046)
<i>Kp</i>	25	60	61	3	89,3	49,6	29,1	95,2	1,8	0,2	
<i>Ac</i>	54	48	47	2	96,3	50,5	52,5	96,0	1,9	0,1	
<i>Pa</i>	23	106	20	0	100,0	84,1	53,5	100,0	6,3	0	
<i>Sa</i>	5	121	23	0	100,0	16,0	82,1	100,0	1,2	0	

**Nhận xét:** Chúng tôi nhận thấy đối với *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* đều có độ nhạy 100%; giá trị dự đoán âm tính là 100% và chỉ số khả dĩ âm tính bằng 0.



**Bảng 3.16.** Giá trị chẩn đoán multiplex realtime PCR chung  
cho cả 5 loại vi khuẩn

	Nuôi cấy (+) (n)	Nuôi cấy (-) (n)	Se	Sp	PPV	NPV	p (CI 95%)
Multiplex realtime PCR (+)	90	43	97,8	24,6	67,7	87,5	< 0,05 (0,618-0,738)
Multiplex realtime PCR (-)	2	14					

**Nhận xét:** Độ nhạy của multiplex realtime PCR trong nghiên cứu là 97,8%; độ đặc hiệu 24,6%; giá trị dự đoán dương tính 67,7%; giá trị dự đoán âm tính 87,5%. Và giá trị chẩn đoán của multiplex realtime PCR so với kết quả nuôi cấy có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

### 3.3. Phân tích vai trò của multiplex realtime PCR trong điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy

#### 3.3.1. Sử dụng kháng sinh phù hợp thời điểm chẩn đoán viêm phổi

**Bảng 3.17.** So sánh việc sử dụng kháng sinh phù hợp khi có kết quả multiplex realtime PCR giữa hai nhóm nghiên cứu

	Cả hai nhóm (n= 242) n (%)	Nhóm nghiên cứu (n= 121)* n (%)	Nhóm chứng (n= 121) ** n (%)	p (*_**)
Sử dụng kháng sinh phù hợp	148 (61,1)	89 (73,6)	59 (48,8)	< 0,05
Sử dụng kháng sinh không phù hợp	88 (36,5)	29 (34,0)	59 (48,8)	
Không rõ	6 (2,4)	3 (2,4)	3 (2,4)	

**Nhận xét:** Tỷ lệ sử dụng kháng sinh phù hợp khác biệt giữa hai nhóm nghiên cứu.

Sự khác biệt này đặc biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

**3.3.2. Thời gian thở máy, thời gian nằm viện điều trị của hai nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu**

**Bảng 3.18.** So sánh thời gian thở máy, thời gian nằm khoa hồi sức, thời gian nằm viện điều trị trong nghiên cứu

Kết quả	Cả hai nhóm (n = 242)	Nhóm nghiên cứu (n= 121) *	Nhóm chứng (n= 121) **	p (*-***)
Thời gian thở máy (Trung bình $\pm$ SD) (ngày)	12,24 $\pm$ 7,98	11,37 $\pm$ 6,36	13,12 $\pm$ 9,27	0,049
Thời gian nằm khoa hồi sức (Trung bình $\pm$ SD) (ngày)	19,66 $\pm$ 13,11	17,80 $\pm$ 14,16	21,51 $\pm$ 11,75	0,028
Thời gian nằm viện (Trung bình $\pm$ SD) (ngày)	19,77 $\pm$ 13,74	17,85 $\pm$ 14,19	21,66 $\pm$ 12,00	0,025

**Nhận xét:** Thời gian thở máy trung bình; thời gian nằm tại khoa Hồi sức tích cực trung bình và thời gian nằm viện trung bình giữa hai nhóm có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê  $p < 0,05$

### 3.3.3. Tỷ lệ tử vong của các bệnh nhân trong nghiên cứu

**Bảng 3.19.** So sánh tỷ lệ tử vong của bệnh nhân hai nhóm nghiên cứu

Kết quả	Cả hai nhóm (n = 242) n (%)	Nhóm nghiên cứu (n= 121) * n (%)	Nhóm chứng (n= 121) ** n (%)	p (*-**)
Tỷ lệ tử vong chung	101(41,7)	42 (34,7)	59 (48,8)	0,022
Tỷ lệ tử vong do VPLQTM	62 (25,6)	26 (21,5)	36 (39,8)	0,141
Tỷ lệ tử vong do VPLQTM ở ngày 7 (n = 10)	72 (29,8)	32 (26,4)	40 (33,1)	0,518
Tỷ lệ tử vong do VPLQTM ở ngày 14 (n= 25)	97 (40,1)	38 (31,4)	59 (48,8)	0,06
Tỷ lệ tử vong do VPLQTM ở ngày 28 (n= 27)	124 (51,2)	52 (43,0)	72 (59,5)	0,838

**Nhận xét:** Tỷ lệ tử vong chung ở cả hai nhóm nghiên cứu có sự khác biệt và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . Tỷ lệ tử vong do viêm phổi liên quan thở máy giữa hai nhóm nghiên cứu không có sự khác biệt thực sự có ý nghĩa thống kê.

**3.3.4. Số bệnh nhân cần áp dụng multiplex realtime PCR để giảm một bệnh nhân tử vong do viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy**

**Bảng 3.20.** Số bệnh nhân cần áp dụng multiplex realtime PCR để giảm một bệnh nhân tử vong do viêm phổi liên quan thở máy

	Nhóm nghiên cứu ( n = 121)	Nhóm chứng (n= 121)	RRR (%)	ARR (%)	NNT
Tỷ lệ tử vong chung	42 (34,7%)	59 (48,8%)	28,9	14,1	7,1
Tỷ lệ tử vong do VPLQTM	26 (21,5%)	36 (39,8%)	46,0	18,3	5,5

**Nhận xét:** Áp dụng multiplex realtime PCR điều trị làm giảm nguy cơ tử vong do viêm phổi là 18,3%. Cần phải áp dụng multiplex realtime PCR cho ít nhất 6 bệnh nhân để có thể làm giảm một bệnh nhân tử vong do VPLQTM.

## CHƯƠNG 4

### BÀN LUẬN

#### 4.1. Đặc điểm chung của hai nhóm bệnh nhân nghiên cứu:

Trong thời gian thực hiện nghiên cứu, chúng tôi đã gặp khó khăn như bệnh dịch covid 19 đã làm giảm số lượng bệnh nhân (BN) nhập viện cũng như nhóm nghiên cứu phải trực tiếp tham gia chống dịch nên đã làm kéo dài thời gian thu thập số liệu nghiên cứu. Tuy nhiên, chúng tôi cũng đã đưa được vào nghiên cứu 242 bệnh nhân và chia đều vào hai nhóm.

##### 4.1.1. Đặc điểm chung lúc nhập viện:

Kết quả ở bảng 3.1 đã cho thấy, tuổi trung bình của BN trong nhóm nghiên cứu là  $66,33 \pm 16,65$  tuổi; trong đó tuổi thấp nhất là 17 tuổi và cao nhất là 96 tuổi; nhóm chứng là  $69,55 \pm 16,46$  tuổi; trong đó thấp nhất là 16 tuổi và cao nhất là 95 tuổi. Như vậy, những bệnh nhân mắc viêm phổi trong nghiên cứu có độ tuổi trung bình khá cao, tuổi  $> 65$  chiếm đa số và tình trạng dinh dưỡng rất kém. Điều này cũng dễ hiểu, vì nhóm những bệnh nhân này mắc nhiều bệnh nền mạn tính và khó khăn trong việc cai máy thở dẫn đến tình trạng phải thở máy dài ngày, tỷ lệ nguy cơ mắc VPLQTM sẽ rất cao.

Chỉ số khối cơ thể (BMI) trung bình của cả hai nhóm đều rất thấp (nhóm nghiên cứu  $21,01 \pm 3,57$ ; nhóm chứng  $20,15 \pm 3,17$ ). Sự khác biệt về tuổi và chỉ số khối cơ thể (BMI) giữa hai nhóm không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ . Tuy nhiên, Pouly và cộng sự ở Pháp (2020) khi nghiên cứu dịch tễ bệnh nhân VPLQTM lại thấy tình trạng bệnh nhân béo phì với BMI  $> 30$  (23,3%) và BMI  $> 35$  (12,6%) là một trong những lý do khó cai thở máy.

Ngoài ra, nam giới chiếm đa số ở nhóm nghiên cứu 72,7%; ở nhóm chứng 69,4%, cũng được giải thích là do các bệnh nhân nam giới thường có các bệnh lý bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính hoặc bệnh lý hôn mê gan- sốc mắt

máu do xuất huyết tiêu hóa vỡ giãn tĩnh mạch thực quản trên nền xơ gan do rượu, tỷ lệ mắc các bệnh lý tim mạch mạn tính. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả các nghiên cứu trong và ngoài nước. Trần Hữu Thông (2013) tuổi trung bình  $57,1 \pm 20,1$  tuổi; tỷ lệ bệnh nhân nam chiếm 59,5%<sup>126</sup>. Hà Sơn Bình (2015) tuổi trung bình của nhóm bệnh nhân VPLQTM  $63,7 \pm 17,34$  tuổi; tương tự nghiên cứu của chúng tôi<sup>30</sup>. Vũ Đình Phú (2017) tuổi trung bình của nhóm BN VPLQTM là 46 tuổi, cao nhất 62 tuổi, thấp nhất là 37 tuổi; chỉ số khối cơ thể trung bình là  $22,12$ <sup>14</sup>. Hoàng Khánh Linh (2018) tỷ lệ nam giới trong nghiên cứu cũng chiếm 61,7%<sup>28</sup>. Arezoo Chouhdari và cộng sự (2018) nghiên cứu về tỷ lệ mắc VPLQTM cũng cho thấy tuổi trung bình nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu  $52,45 \pm 21,04$  tuổi; giới nam chiếm 69%; chỉ số khối cơ thể  $26,20 \pm 7,09$ <sup>24</sup>.

Lý do đặt ống nội khí quản chiếm tỷ lệ cao nhất là do căn nguyên bệnh lý hô hấp (nhóm can thiệp 47,1%; nhóm chứng 38,8%). Các bệnh lý gây hô hấp thường gặp khi vào viện cần phải đặt ống nội khí quản bao gồm các bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, cơn hen phế quản nặng hoặc nguy kịch, các tình trạng viêm phổi nặng hoặc hội chứng suy hô hấp cấp tiến triển. Tiếp đến là các rối loạn ý thức (nhóm can thiệp 27,3%; nhóm chứng 38,0%). Các rối loạn ý thức này bao gồm bệnh lý mạch máu não (xuất huyết não, tắc động mạch não, xuất huyết dưới nhện), nhóm bệnh lý nhiễm khuẩn thần kinh (viêm màng não, viêm não), một số rối loạn ý thức khác do nhiễm khuẩn huyết nặng (sepsis), rối loạn chuyển hóa, hôn mê gan, ngộ độc thuốc ngủ, thuốc trừ sâu. Nhóm chấn thương sọ não (nhóm can thiệp và nhóm chứng đều là 4,1%), còn lại là tình trạng sốc (do nhiễm khuẩn, sốc mất máu do xuất huyết tiêu hóa nặng và sốc chấn thương), để đảm bảo ổn định cung cấp oxy khi BN có tụt huyết áp. Cuối cùng lý do đặt ống nội khí quản là nguyên nhân ngừng tuần hoàn (nhóm can thiệp và nhóm chứng là 1,7%), các bệnh nhân ngừng tuần

hoàn được đưa vào viện có trường hợp không rõ nguyên nhân và toan hô hấp nặng. Trong nghiên cứu của chúng tôi, có thể có nhiều lý do đặt ống nội khí quản trên cùng một bệnh nhân mà đôi khi bác sỹ lâm sàng cấp cứu không thật sự phân loại chính xác lý do là gì. Theo Trần Hữu Thông (2013) khi nghiên cứu bệnh nhân vào khoa cấp cứu với lý do nội khoa tại khoa Cấp cứu, nguyên nhân đặt ống nội khí quản đứng đầu là bệnh lý thần kinh 48,4%; tiếp theo là suy hô hấp chiếm 36,6%<sup>126</sup>. Arezoo Chouhdari (2018) thống kê lý do bệnh nhân phải thở máy chung cho cả bệnh viện nên nhiều nhất là nguyên nhân hôn mê chiếm 48,5%, tiếp theo là phẫu thuật 36,4%<sup>24</sup>. Như vậy chúng ta đều nhận thấy, lý do đặt nội khí quản ở các nghiên cứu trong và ngoài nước đều có tính tương đồng.

Khoa hồi sức cấp cứu, khoa cấp cứu nội là hai khoa chỉ định và đặt nội khí quản chính trong nghiên cứu (tỷ lệ đặt nội khí quản ở khoa hồi sức tích cực ở cả hai nhóm là 74,2%; khoa cấp cứu 7,6%); xếp ở vị trí thứ ba đặt nội khí quản cấp cứu người bệnh là các khoa nội (4,0%), cuối cùng là đặt nội khí quản là nhằm mục đích phẫu thuật (3,6%). Một lý giải khá thú vị cho chẩn đoán VPLQTM ở bệnh nhân phẫu thuật, đó là do bệnh nhân có bệnh lý nền khá nhiều hoặc bệnh nhân đã rơi vào tình trạng sốc nên sau phẫu thuật đã không thể rút được ống nội khí quản ngay.

Do nghiên cứu thực hiện chủ yếu ở các khoa hồi sức tích cực nên số lượng bệnh nhân viêm phổi bệnh viện chiếm tỷ lệ rất nhỏ (nhóm nghiên cứu 2,7%; nhóm chứng 1,7%), đa số là các bệnh nhân viêm phổi liên quan thở máy (nhóm nghiên cứu 97,3%; nhóm chứng 98,3%).

#### **4.1.2. Đặc điểm các bệnh lý đi kèm**

Trong các loại bệnh lý đi kèm và các yếu tố ảnh hưởng đến hệ miễn dịch của các BN nghiên cứu (Biểu đồ 3.1) thì tỷ lệ cao nhất là các loại bệnh lý tim mạch như bệnh nhồi máu cơ tim cấp, suy tim, tăng huyết áp..



(nhóm nghiên cứu 52,9%; nhóm chứng 53,7%); tiếp theo là các bệnh lý mạch máu não, đó là xuất huyết não, tắc mạch não, xuất huyết dưới nhện (nhóm nghiên cứu 28,1%; nhóm chứng 33,3%); các bệnh phổi mạn tính (nhóm nghiên cứu 10,7%; nhóm chứng 15,7%); xơ gan rượu (nhóm nghiên cứu 9,9%; nhóm chứng 8,3%); đái tháo đường (nhóm nghiên cứu 18,2%; nhóm chứng 17,4%);. Ngoài ra, một số bệnh lý khác như ung thư; sử dụng corticoid toàn thân; sử dụng các thuốc ức chế miễn dịch chiếm một phần nhỏ. Điều quan trọng là không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về bệnh lý đi kèm giữa hai nhóm nghiên cứu với  $p > 0,05$ .

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các nghiên cứu khác trong và ngoài nước về các loại bệnh lý đi kèm của BN được sàng lọc vào nghiên cứu, nhưng thứ tự tỷ lệ mắc các bệnh lý nền có đôi chút khác nhau do đặc điểm bệnh viện nơi thu thập số liệu, chuyên ngành của nghiên cứu viên, cũng như mục tiêu của từng nghiên cứu<sup>29,126,127</sup>. Othman (2017) tỷ lệ bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính chiếm 58,8%, tiếp theo là đái tháo đường 41,1%<sup>10</sup>. Nhưng nghiên cứu dịch tễ VPLQTM ở Thổ Nhĩ Kỳ (2016) cho thấy bệnh lý nền nhiều nhất là tăng huyết áp 57,8%, tiếp theo là đái tháo đường 35,3%, rồi mới đến bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD) 27,3%<sup>3</sup>.

#### **4.1.3. Một số đặc điểm lâm sàng của hai nhóm**

Bảng 3.2 cho chúng ta cái nhìn toàn cảnh về đặc điểm lâm sàng BN trong nghiên cứu lúc chẩn đoán VPBV, VPLQTM. Số bệnh nhân hôn mê có điểm Glasgow < 7 điểm (nhóm nghiên cứu 6,8%; nhóm chứng 4,7%); Glasgow 7- 10 điểm (nhóm nghiên cứu 26,2%; nhóm chứng 29,0%).

Chiếm đến 49,5% BN ở nhóm nghiên cứu và 45,5% BN ở nhóm chứng có tăng tiết nhiều dịch phế quản (DPQ) ở thời điểm chẩn đoán VPBV, VPLQTM, tiếp theo là số lượng DPQ ít (nhóm nghiên cứu 43,8%; nhóm chứng 45,5%), bệnh nhân có DPQ đục mủ (ở nhóm nghiên cứu 0,0% nhóm

chúng 3,3%), số lượng bệnh nhân không rõ triệu chứng đờm thể nào chiếm tỷ lệ 6,6% ở nhóm nghiên cứu và 5,8% ở nhóm chứng. Không có bệnh nhân nào hạ nhiệt độ < 36°C khi chẩn đoán VPBV, VPLQTM.

Tỷ lệ sốc nhiễm khuẩn ngay khi chẩn đoán VPBV, VPLQTM khá cao (nhóm nghiên cứu 25,6%; nhóm chứng 36,4%). Dấu hiệu sốc nhiễm khuẩn là một trong những yếu tố nguy cơ nhiễm các VK kháng đa kháng sinh<sup>128</sup>.

#### **4.1.4. Một số đặc điểm cận lâm sàng thời điểm chẩn đoán viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy**

##### **4.1.4.1. Xét nghiệm máu**

Số lượng bạch cầu trung bình đều cao ở cả hai nhóm trong nghiên cứu (nhóm nghiên cứu:  $16,03 \pm 8,04$  G/l, nhóm chứng:  $14,49 \pm 6,38$  G/l). Ngoài ra, hầu hết các BN trong nghiên cứu số lượng bạch cầu tăng, tỷ lệ BN số lượng bạch cầu giảm < 4 G/l chỉ chiếm 0,8% ở cả hai nhóm. Hoàng Khánh Linh (2018) cũng gặp bạch cầu tăng  $\geq 12$  G/l chiếm 87,0%, bạch cầu giảm < 4 G/l chỉ chiếm 7,5%<sup>28</sup>.

Nồng độ procancitonin máu ở thời điểm chẩn đoán VPLQTM: từ 2- 10 ng/ml: nhóm nghiên cứu: 28,6%, nhóm chứng: 20,7%; > 10ng/ml: nhóm nghiên cứu: 28,6%, nhóm chứng: 25,3%.

Nồng độ lactat máu từ 2,2- 4 ng/ml: nhóm nghiên cứu: 18,9%, nhóm chứng: 25,3%; > 4ng/ml: nhóm nghiên cứu: 11,1%, nhóm chứng: 6,3%.

Điều quan trọng là sự khác biệt giữa các chỉ số như: số lượng bạch cầu, nồng độ procancitonin, nồng độ lactat máu không có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm nghiên cứu với  $p > 0,05$  (Bảng 3.3).

Tuy nhiên, tỷ lệ số bệnh nhân có nồng độ albumin máu trung bình lúc chẩn đoán VPBV, VPLQTM ở nhóm nghiên cứu ( $25,38 \pm 4,45$  g/l) thấp hơn hẳn so với nhóm chứng ( $28,11 \pm 4,49$  g/l) với  $p < 0,001$ , điều này cũng phù hợp với thống kê lúc vào viện (Bảng 3.1) cho thấy chỉ số khối cơ thể trung

bình của các bệnh nhân trong nghiên cứu rất thấp ( $20,58 \pm 3,39$  g/l) vì đa số bệnh nhân trong nghiên cứu đều mắc các bệnh mạn tính lâu ngày dẫn đến tình trạng suy kiệt. Ngoài ra, một chỉ số nữa cũng được nhóm nghiên cứu đưa vào để chứng minh tình trạng nhiễm khuẩn nặng ở những bệnh nhân VPLQTM là tỷ lệ urê/albumin máu. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ urê/albumin máu ở nhóm nghiên cứu ( $0,58 \pm 0,51$ ) cao hơn hẳn nhóm chứng ( $0,41 \pm 0,25$ ) có ý nghĩa thống kê với  $p = 0,004$  (Bảng 3.3). Một nghiên cứu hồi cứu, thuần tập lớn đã được thực hiện ở Trung quốc kéo dài từ năm 2014 đến năm 2017 khi phân tích giữa nhóm sống và tử vong ở bệnh nhân VPLQTM thấy nồng độ albumin máu  $< 30$ g/l và số lượng bạch cầu trung bình giữa hai nhóm không có sự khác biệt, ngoài ra nghiên cứu cũng đã lý giải nguyên nhân khi viêm phổi, tình trạng nhiễm khuẩn tăng lên thận sẽ tăng tái hấp thu urê ở ống thận dẫn đến làm tăng tỷ lệ urê/albumin trong máu <sup>29</sup>.

#### 4.1.4.2. Khí máu động mạch

Một số nghiên cứu trên thế giới không đề cập đến khí máu động mạch, nhưng có một điều hiển nhiên là có một mối liên quan rất chặt giữa tỷ lệ tử vong, tỷ lệ nhiễm vi khuẩn đa kháng nếu BN có  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 240$ mmHg, cũng như phối hợp với tổn thương trên phim XQ ngực nặng nề và loại trừ được các nguyên nhân tim mạch, đó chính là hội chứng suy hô hấp cấp tiến triển (ARDS) xuất hiện ngay khi chẩn đoán VPLQTM <sup>127,129,130</sup>. Theo trường phái này, ở Việt Nam các đơn vị hồi sức tích cực vẫn rất chú trọng xét nghiệm khí máu động mạch trong chẩn đoán và điều trị VPLQTM; xét nghiệm khí máu giúp tiên lượng và sử dụng phối hợp chỉ định các biện pháp điều trị tích cực như theo dõi thở máy cho BN ARDS, lọc máu liên tục tại giường, biện pháp tuần hoàn ngoài cơ thể (ECMO) để chờ phổi hồi phục.

Tỷ lệ bệnh nhân có tình trạng toan máu  $\text{pH} \leq 7,35$  chiếm 22,8%;  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 240$  mmHg chiếm 45%;  $\text{PaO}_2 < 60$ mmHg chiếm 7%. Điều đó

thể hiện tình trạng chuyển hóa thiếu oxy và tổn thương phổi nặng kèm sóc nhiễm khuẩn ở cả hai nhóm nghiên cứu. Chênh áp oxy phế nang mao mạch (A- aDO<sub>2</sub>) cũng vậy và nó phản ánh tình trạng dày, viêm màng phế nang mao mạch, cản trở trao đổi oxy qua màng, tỷ lệ lúc nhập viện ở các mức đều thấp hơn lúc chẩn đoán VPBV, VPLQTM (Bảng 3.4).

#### 4.1.4.3. Tổn thương phổi trên XQ ngực – cắt lớp vi tính ngực

XQ phổi là một trong những tiêu chuẩn quan trọng để chẩn đoán viêm phổi ở những bệnh nhân bình thường, tuy nhiên trong VPLQTM thì dường như lại không đúng, mặc dù tiêu chuẩn chẩn đoán vẫn đưa ra như là một điều kiện cần. Trong nghiên cứu của chúng tôi (Bảng 3.5), tổn thương mới trên XQ ngực ở tất cả các vị trí chỉ chiếm cao nhất là một nửa (nhóm nghiên cứu 43%, nhóm chứng 51,2%), tổn thương trên phim cắt lớp lồng ngực chiếm tỷ lệ cao nhất là tổn thương toàn bộ phổi phải (nhóm nghiên cứu 42,1%, nhóm chứng 29,8%), tiếp đến là toàn bộ phổi trái (nhóm nghiên cứu 38%, nhóm chứng 25,6%). Tỷ lệ tổn thương phổi phải nói chung, đặc biệt là thùy dưới phổi phải cũng cao hơn phổi trái. Điều này được giải thích do cấu tạo kinh điển của phế quản gốc phải dốc hơn, ngắn hơn và lớn hơn phế quản gốc trái, thêm vào đó cơ chế của VPLQTM là sự di chuyển của vi khuẩn. Đây cũng chính là lý do nghiên cứu của chúng tôi chuyển phương pháp lấy bệnh phẩm từ nội soi phế quản sang kỹ thuật lấy bệnh phẩm bằng sonde hút đờm mù ở đầu xa mà cũng không lo sai lệch kết quả nghiên cứu.

Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu khác. Hoàng Khánh Linh (2018) thu thập số liệu ở khoa Điều trị tích cực bệnh viện Bạch mai nên cũng có kết quả giống nghiên cứu của chúng tôi đa số là gặp tổn thương thâm nhiễm và đông đặc, không gặp bệnh nhân nào có hình ảnh hang<sup>28</sup>. Sadigov (2018) cũng thấy tổn thương nhiều thùy 73.5%; cả hai phổi 52,1% và điều đặc biệt nghiên cứu cũng không gặp hình ảnh tổn thương hang<sup>127</sup>.

#### 4.1.4.4. Kết quả nuôi cấy vi khuẩn bệnh phẩm đường hô hấp

Kết quả nuôi cấy dịch phế quản ở cả hai nhóm nghiên cứu (Bảng 3.6) chúng tôi nhận thấy gặp nhiều vẫn là nhóm 5 vi khuẩn: nhóm trực khuẩn gram âm, chiếm tỷ lệ lớn nhất là *A.baumannii* 34,3%; tiếp đến là *K.pneumoniae* 17,4%; *P.aeruginosa* 12,0%; *E.coli* 2,9%. Cầu khuẩn gram dương thì đứng đầu vẫn là *S.aureus* chiếm 3,3%. Các nghiên cứu lớn ở Việt nam cũng như ở các nước châu Á đang phát triển thì cho đến hiện nay căn nguyên vi khuẩn gây bệnh VPBV, VPLQTM chiếm tỷ lệ cao thường gặp ở các đơn vị Hồi sức cấp cứu vẫn là 5 loại: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*<sup>9,10,11,12,69</sup>, cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi.

Một phân tích gộp và hệ thống rất lớn được tiến hành ở các nước châu Á gồm 538.600 bệnh nhân từ 22 quốc gia châu Á, đã có kết quả giống như nghiên cứu của chúng tôi, đó là tỷ lệ nhiễm *A.baumannii* lớn nhất 26%; tiếp theo là *P.aeruginosa* 22%; *K.pneumoniae* 14% và *S.aureus* 14%. Nghiên cứu cũng đưa ra một kết luận tỷ lệ nhiễm *A.baumannii* cao thường gặp ở các nước thu nhập thấp và nhiệt đới; chuyên dân tỷ lệ nhiễm *P.aeruginosa* và *S.aureus* cao ở các nước có thu nhập cao và phi nhiệt đới<sup>26</sup>. Chính vì vậy, thiết kế môi cho phản ứng PCR trong nghiên cứu chúng tôi tập trung phát hiện 5 loại vi khuẩn này. Tuy nhiên, thực tế hiệu quả phát hiện, giá trị của phản ứng PCR thế nào trong thì cần xem xét đánh giá trong nhiều nghiên cứu, hoặc kết hợp nghiên cứu đa trung tâm với số lượng bệnh nhân rất lớn.

#### 4.1.4.5. Tỷ lệ kháng kháng sinh của 5 loại vi khuẩn gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy trong nghiên cứu

Ở Việt nam, tỷ lệ đề kháng kháng sinh của vi khuẩn cao nhất châu Á, tình trạng nhiễm khuẩn đa kháng đặc biệt nghiêm trọng nếu liên quan đến nhiễm khuẩn bệnh viện và có thể gây ra hàng nghìn ca tử vong mỗi năm. Việc phát

hiện, ngăn chặn và kiểm soát tình trạng kháng thuốc đòi hỏi nỗ lực phối hợp của nhiều cơ quan, bộ ngành, ngoài ra cần có cả sự hợp tác quốc tế. CDC Việt nam đã hợp tác với Tổ chức Y tế thế giới (WHO), Đơn vị nghiên cứu lâm sàng Oxford, Hiệp hội dịch tễ lâm sàng... để có thể hỗ trợ trực tiếp việc thực hiện Kế hoạch Hành động Quốc gia Việt nam về phòng chống kháng kháng sinh.

Trong VPBV, đặc biệt VPLQTM, tỷ lệ căn nguyên vi khuẩn gây bệnh cũng như nguy cơ đề kháng các loại kháng sinh thay đổi ở nhóm viêm phổi sớm hay muộn, ở từng bệnh viện, từng quốc gia và từng thời kỳ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi không đi sâu phân tích vào tỷ lệ vi khuẩn nhóm VPLQTM sớm vì đa phần các nghiên cứu trước đã chỉ ra rằng vi khuẩn gây bệnh ở nhóm này thường giống vi khuẩn cộng đồng hoặc ít kháng thuốc. Đối với các trường hợp mắc VPLQTM muộn, vi khuẩn gây bệnh là các vi khuẩn từ môi trường thở máy xâm nhập vào đường hô hấp. Con đường trung gian truyền bệnh hay gặp là qua bàn tay chăm sóc và khám bệnh của nhân viên y tế. Do đó, tác nhân vi khuẩn gây VPLQTM ở những bệnh nhân thở máy kéo dài thường là các vi khuẩn đa kháng thuốc. Có nhiều thách thức khác nhau đối với các bác sỹ trong điều trị VPLQTM. Một nghiên cứu gần đây ở vương quốc Bỉ cho thấy căn nguyên có đến 60% là do trực khuẩn gram âm, trong đó *Pseudomonas aeruginosa* là 24% và *Klebsiella spp.* là 11%, đây là vi khuẩn thường xuyên nhất phân lập được. Đáng chú ý là các yếu tố nguy cơ đối với vi khuẩn đa kháng thuốc ở nhóm BN bị VPLQTM không được xác định rõ. Mặt khác, các chủng vi khuẩn kháng đa kháng sinh này thường nhận được liệu pháp điều trị không thích hợp và nó có thể đưa đến một tiên lượng xấu<sup>131</sup>. Theo một dự báo của Anh sau khi xem xét toàn bộ thực trạng về kháng kháng sinh đã dự báo đến năm 2050 số người chết vì kháng kháng sinh sẽ là 10 triệu người vượt hơn số lượng tử vong do ung thư, tai nạn giao thông hay các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm khác<sup>132</sup>.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tình hình kháng kháng sinh cũng phù hợp với tổng kết của CDC và các nghiên cứu khác trước đó. Có nghĩa là tỷ lệ kháng kháng sinh của các vi khuẩn phát hiện trong nghiên cứu đều tăng lên hơn khi so sánh với các nghiên cứu về VPBV, VPLQTM cùng thực hiện ở khoa Hồi sức trong thời gian trước đó. Cụ thể đối với *Acinetobacter baumannii* kháng gần hết các loại kháng sinh (Biểu đồ 3.3), kháng gần 100% với ceftriaxon, ceftazidim, cefepim, cefoperazon và đặc biệt kháng cả với nhóm carbapenem. Riêng đối với colistin là nhóm kháng sinh đặc biệt, sẽ là một trong những lựa chọn điều trị cuối cùng VPLQTM thì vi khuẩn này cũng kháng đến 10%. Nhưng Trần Hữu Thông (2013), Hà Sơn Bình (2015), Hoàng Khánh Linh (2018) thì tỷ lệ nhạy cảm của *Acinetobacter baumannii* với colistin đều là 100%<sup>28, 30, 126</sup>.

Đối với *Klebsiella pneumonia* tỷ lệ đề kháng thuốc cũng tăng lên nhanh chóng (Biểu đồ 3.4). Chỉ riêng với colistin thì *Klebsiella pneumonia* tỷ lệ kháng đã lên đến xấp xỉ 40% (Hoàng Khánh Linh vẫn còn nhạy 100%<sup>28</sup>. Nhóm carbapenem là “vũ khí cuối cùng” tỷ lệ kháng cũng tăng lên theo từng năm, đối với meropenem của chúng tôi kháng 40% (Trần Hữu Thông kháng hơn 10%<sup>126</sup>, Hà Sơn Bình kháng 20%<sup>30</sup>). Theo rất nhiều tài liệu vi sinh được công bố gần đây, *Klebsiella pneumonia* liên tục thay đổi cơ chế kháng thuốc cũng như xuất hiện và thay đổi rất nhanh các gen đột biến kháng thuốc. Do đó việc điều trị viêm phổi do *Klebsiella pneumonia* đa kháng rất khó khăn hơn *Acinetobacter baumannii* ở hiện tại.

Giống như các trực khuẩn gram âm khác trực khuẩn mũ xanh (*Pseudomonas aeruginosa*) cũng có tỷ lệ đề kháng tăng lên ở nhiều nhóm kháng sinh từ trước vẫn được coi là lựa chọn tốt để điều trị nhiễm khuẩn mà căn nguyên là do *Pseudomonas aeruginosa*. Trực khuẩn mũ xanh kháng hơn 30% với colistin, kháng 100% với kháng sinh nhóm ampicillin/sulbactam-

cefoperazon/sulbactam, kháng hơn 70% với kháng sinh nhóm piperacillin/tazobactam (Biểu đồ 3.5) (Trần Hữu Thông kháng 100% với ampicillin/sulbactam, kháng 50% với piperacillin/tazobactam<sup>126</sup>).

Chỉ còn trực khuẩn gram âm cuối cùng trong nghiên cứu, *Escherichia coli* là còn nhạy 100% với colistin và hơn 60% với amikacin (Biểu đồ 3.6), kháng 100% với kháng sinh nhóm cephalosporin, kháng sinh có kết hợp sulbactam, ticarcillin và gentamycin. Tỷ lệ kháng này so với các nghiên cứu khác cũng đã tăng đáng kể<sup>30,126</sup>.

Cầu khuẩn gram dương duy nhất trong nghiên cứu của chúng tôi, *Staphylococcus aureus* kháng 100% với methicillin, điều đáng mừng là cầu khuẩn này vẫn còn nhạy cảm 100% với vancomycin và linezolid (Biểu đồ 3.7). Phù hợp với nghiên cứu của Hà Sơn Bình (2015)<sup>30</sup>, Hoàng Khánh Linh (2018)<sup>28</sup>.

#### **4.1.5. Các yếu tố liên quan đến tỷ lệ tử vong do viêm phổi trong nghiên cứu**

VPLQTM là một nhiễm khuẩn bệnh viện nghiêm trọng nhưng lại rất thường gặp, bệnh cần được điều trị ngay sau khi chẩn đoán. Trong nghiên cứu của chúng tôi (bảng 3.13) thể hiện phân tích các yếu tố liên quan đến tỷ lệ tử vong chung của cả hai nhóm nghiên cứu, với phân tích đơn biến có nhiều yếu tố độc lập dự báo nguy cơ tử vong ở bệnh nhân cả hai nhóm có ý nghĩa thống kê, đó là tuổi  $\geq 65$ , có tình trạng sốc nhiễm khuẩn ngay khi chẩn đoán VPLQTM, sử dụng kháng sinh không phù hợp, có yếu tố nhiễm vi khuẩn đa kháng, thời gian nằm viện  $\geq 10$  ngày, tỷ lệ ure/albumin máu và nồng độ albumin máu là những yếu tố dự báo nguy cơ độc lập liên quan tỷ lệ tử vong trong ở bệnh nhân VPLQTM có ý nghĩa với  $p < 0,05$ . Tuy nhiên, cũng các yếu tố đó khi phân tích đa biến chỉ có sốc nhiễm khuẩn và sử dụng kháng sinh không phù hợp là hai yếu tố độc lập dẫn đến tử vong ở bệnh nhân bị



VPLQTM với tỷ suất chênh lần lượt là OR= 1,687; 95%CI (0,687- 4,142) với  $p= 0,049$  và OR= 0,437; 95%CI (0,203- 0,945) với  $p= 0,035$ ).

Thực hiện phân tích với nhóm nghiên cứu (Bảng 3.14), chúng tôi cũng thấy các yếu tố tình trạng sốc nhiễm khuẩn, sử dụng kháng sinh không phù hợp, có yếu tố nhiễm vi khuẩn đa kháng,  $PaO_2/FiO_2 < 200$ , thời gian nằm viện  $\geq 10$  ngày, tỷ lệ nồng độ urê/albumin và nồng độ albumin máu là những yếu tố có nguy cơ độc lập dự báo tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân VPLQTM có ý nghĩa với  $p < 0,05$ . Ở đây yếu tố tuổi  $\geq 65$  không còn là yếu tố dự báo nguy cơ tử vong giống như khi phân tích đơn biến ở cả hai nhóm nghiên cứu nữa. Điều này cũng thấy ở nhiều nghiên cứu khác trên thế giới. Cũng với mô hình phân tích đa biến này ở nhóm nghiên cứu, yếu tố điều trị kháng sinh theo kinh nghiệm không phù hợp khi chẩn đoán VPLQTM là một yếu tố trung thành nhất có giá trị dự báo độc lập nguy cơ tử vong với OR 0,229; 95% CI (0,054- 0,979) với  $p= 0,047$  (bảng 3.14). Các yếu tố khác như tình trạng sốc nhiễm khuẩn,  $pH < 7,15$ ,  $PaO_2/FiO_2 < 200$  không ảnh hưởng đến tỷ lệ tử vong trong mô hình phân tích đa biến này.

Cả phân tích đơn biến và đa biến thì ở nhóm chúng cũng chỉ ra rằng có duy nhất yếu tố sử dụng kháng sinh không phù hợp là yếu tố độc lập dẫn đến tử vong ở bệnh nhân VPLQTM (phân tích đơn biến OR 1,414, 95% CI (0,68- 2,94),  $p= 0,035$ ; phân tích đa biến OR 0,645, 95% CI (0,232- 1,792),  $p= 0,040$ ). Còn các yếu tố khác như tình trạng sốc nhiễm khuẩn, có yếu tố nhiễm vi khuẩn đa kháng, nồng độ albumin máu là những yếu tố dự báo nguy cơ độc lập liên quan tỷ lệ tử vong trong ở bệnh nhân VPLQTM có ý nghĩa khi phân tích đơn biến nhưng khi phân tích đa biến thì không còn có ý nghĩa nữa. Các yếu tố như tuổi  $\geq 65$ , thời gian nằm viện  $\geq 10$  ngày,  $pH \leq 7,15$ ,  $PaO_2/FiO_2 < 200$  không phải là các yếu tố dự báo nguy cơ tử vong cả khi phân tích đơn biến lẫn khi phân tích đa biến với  $p > 0,05$ .

Khi tìm hiểu các yếu tố nguy cơ liên quan đến tỷ lệ tử vong trong vòng 30 ngày do VPLQTM, Feng và cộng sự (2019) đã tìm thấy có tăng tỷ lệ giữa số lượng bạch cầu đa nhân và số lượng bạch cầu lympho (BCĐN/LP); tăng tỷ lệ giữa nồng độ ure và albumin máu; nhiễm vi khuẩn đa kháng và điểm SOFA cao. Lý giải của nhóm nghiên cứu đưa ra là bạch cầu trung tính và các tế bào viêm tăng cao có thể dự báo giai đoạn tiền sốc nhiễm khuẩn, chính vì vậy ở những bệnh nhân này số lượng bạch cầu đa nhân trung tính tăng và số lượng bạch cầu lympho giảm dẫn đến tỷ lệ này tăng lên. Do đó, trên lâm sàng có thể sử dụng tỷ lệ này để phân tầng nguy cơ sốc nhiễm khuẩn cần điều trị phù hợp để giúp làm giảm tỷ lệ tử vong do VPLQTM. Ngoài ra, Feng cũng cho rằng trong VPLQTM thì nồng độ ure máu tăng lên và albumin giảm hơn ở nhóm những bệnh nhân tử vong, đặc biệt tỷ lệ tử vong do VPLQTM ở ngày thứ 30, điều này cũng phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi <sup>29</sup>.

Một nghiên cứu ở Azerbaijan khi phân tích đơn biến thấy có sự khác biệt giữa hai nhóm sống và tử vong, đó là các yếu tố tuổi, bệnh lý thần kinh, có can thiệp đặt catheter tĩnh mạch trung tâm, suy tim mạn tính, suy thận, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, suy dinh dưỡng, phải lọc máu, tổn thương thâm nhiễm nhiều thùy phổi và phổi cả hai bên, thở máy không xâm nhập trước khi đặt ống nội khí quản,  $PaO_2/FiO_2 \leq 250$ , nhiễm khuẩn huyết nặng và/ hoặc có sốc nhiễm khuẩn, nhiễm *A.baumannii* đa kháng <sup>127</sup>. Trái ngược với những nghiên cứu ở các nước phát triển, Azerbaijan là một nước đang phát triển nên có những kết luận của nghiên cứu phù hợp với thực tế ở Việt nam. Thứ nhất, tình trạng suy dinh dưỡng là một nguyên nhân chính có tính chất quyết định kết quả điều trị bệnh nhân VPLQTM, vì vậy nên đưa việc sàng lọc dinh dưỡng bệnh nhân VPLQTM để đánh giá nguy cơ tiên lượng, và BMI > 21 tăng tỷ lệ sống ở bệnh nhân VPLQTM hay nói cách khác BMI thấp là yếu tố độc lập dự báo tăng nguy cơ tử vong ở bệnh nhân VPLQTM. Thứ

hai, ở những bệnh nhân VPLQTM có bệnh lý nền là bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chiếm 34,7% trong nghiên cứu), không có gì là ngạc nhiên khi xuất hiện dấu hiệu suy giảm nghiêm trọng chức năng phổi, hạ huyết áp và giảm chỉ số PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> và có thể dẫn đến các biến chứng tim- mạch máu cấp tính khác nữa <sup>127</sup>.

Đánh giá được mức độ nguy hiểm khi căn nguyên gây VPLQTM là các trực khuẩn gram âm đường ruột kháng kháng sinh nhóm carbapenem, các nhà khoa học Brazil đã thực hiện một nghiên cứu với mục đích đánh giá các yếu tố liên quan đến tỷ lệ tử vong ở những bệnh nhân VPLQTM có căn nguyên gây bệnh đã được xác định là trực khuẩn đường ruột kháng carbapenem. Có đến 72,3% BN điều trị kháng sinh theo kinh nghiệm không phù hợp trong vòng 24 giờ đầu. Kháng sinh theo kinh nghiệm thường gặp nhất là sử dụng carbapenem và được coi là không phù hợp, ngay cả khi kết hợp với một kháng sinh khác vì không có chủng vi khuẩn nào trong nghiên cứu có nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) < 8mg/l <sup>133</sup>.

Một nhóm nhà khoa học ở Iran (2018) thì lại nhận thấy tuổi > 40, thời gian thở máy > 96 giờ, đái tháo đường không kiểm soát tốt dự báo nguy cơ tử vong cao hơn nhóm còn lại <sup>24</sup>. Đặc biệt trong nghiên cứu này chỉ có điểm APACHE II ≥ 9 và điểm SOFA > 6 với phân tích đơn biến là yếu tố dự đoán gia tăng tỷ lệ tử vong với tỷ suất chênh lần lượt là 3,815- 95% CI (1,39 – 10,50) với p= 0,006; 0,458- 95% CI (0,25 – 0,83) với p= 0,009.

Tổng kết bệnh nhân trong khoảng thời gian 5 năm tại đơn vị Hồi sức tích cực, Sadigov và cộng sự khi phân tích đa biến đã đi đến kết luận các yếu tố có liên quan độc lập với tỷ lệ tử vong do VPLQTM là suy dinh dưỡng, tổn thương thâm nhiễm phổi cả hai bên, nhiễm *A.baumannii* đa kháng thuốc, nhiễm khuẩn huyết nặng và/ hoặc có sốc nhiễm khuẩn, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính và PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ≤ 250. Trong đó, tỷ lệ PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ≤ 250 là yếu tố dự

báo mạnh mẽ nhất. Đối với những bệnh nhân đã xác định được căn nguyên gây bệnh, nghiên cứu chỉ ra rằng có sự gia tăng tỷ lệ tử vong khi nhiễm *A.baumannii* đa kháng thuốc, và chỉ có nhiễm *A.baumannii* đa kháng thuốc là yếu tố nguy cơ độc lập liên quan đến tử vong do VPLQTM mà ở các căn nguyên vi khuẩn đa kháng khác không có (như *P.auruginosa*, *E.coli*, *K.pneumonia*, *MRSA* đa kháng) <sup>127</sup>. Điểm APACHE II  $\geq 9$  và SOFA  $\geq 6$  khi phân tích hồi quy đa biến trong nghiên cứu của chúng tôi không có ý nghĩa trong việc dự đoán gia tăng tỷ lệ tử vong. Karakuzu và cộng sự (2018) thì lại cho rằng điểm APACHE  $> 21$  và điểm SOFA được tính toán ở hai thời điểm lúc nhập viện và lúc chẩn đoán VPLQTM đều  $> 6$  có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm sống và chết. Tuy nhiên, khi phân tích hồi quy đa biến được thực hiện chỉ với điểm SOFA  $> 6$  khi chẩn đoán VPLQTM mới là yếu tố độc lập dự đoán tăng tỷ lệ tử vong. Giải thích được đưa ra là điểm APACHE II không bị ảnh hưởng của thở máy và sử dụng thuốc vận mạch, do đó có thể không đủ điều kiện để xác định rối loạn chức năng cơ quan và tử vong có phải do VPLQTM <sup>4</sup>. Khi xuất hiện tình trạng nhiễm khuẩn nặng có biểu hiện suy đa tạng, rối loạn đa chức năng cơ quan thì điểm SOFA lại tỏ ra ưu thế trong tiên đoán nguy cơ tử vong. Chính vì vậy, Karakuzu khuyến cáo nên dùng SOFA là thang điểm dự báo nguy cơ và giúp cải thiện tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân VPLQTM <sup>4</sup>. Kết quả nghiên cứu cung cấp cho các bác sỹ lâm sàng đặc biệt là các bác sỹ chuyên khoa hồi sức cấp cứu công cụ để tiên lượng nguy cơ tử vong ở BN VPLQTM, giúp họ có thể nhanh chóng có các quyết định điều trị tốt nhất đối với VPLQTM để cứu sống người bệnh.

## **4.2. Giá trị multiplex realtime PCR trong chẩn đoán viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy**

### **4.2.1. So sánh khả năng phát hiện 5 loại vi khuẩn gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy**

#### **4.2.1.1. So sánh khả năng phát hiện 5 loại vi khuẩn gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy**

Bảng 3.10 cho thấy kỹ thuật multiplex realtime PCR có khả năng phát hiện vi khuẩn cao hơn nuôi cấy vi khuẩn (multiplex realtime PCR 89,3%- nuôi cấy 61,7% với  $p < 0,001$ ); cả multiplex realtime PCR và nuôi cấy đều có khả năng phát hiện nhiều loại vi khuẩn trong cùng một mẫu bệnh phẩm nhưng tỷ lệ đó multiplex realtime PCR có phần cao hơn trong tất cả những lần thực hiện kỹ thuật có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ . Thời gian cho kết quả của kỹ thuật multiplex realtime PCR trung bình là  $8,20 \pm 3,37$  giờ thấp hơn hẳn so với thời gian trả kết quả trung bình của kỹ thuật nuôi cấy là  $52,82 \pm 11,70$  giờ với  $p < 0,001$ .

Nghiên cứu của Hou cho kết quả tương tự chúng tôi: nuôi cấy dương là 38,2% và multiplex realtime PCR là 88,2%, trong các mẫu nuôi cấy âm tính multiplex realtime PCR còn phát hiện thêm được 81% (tính trên những mẫu âm tính), 50% (tính trên tổng tất cả mẫu của nghiên cứu) <sup>134</sup>.

Thực ra với kết quả này cũng không làm ngạc nhiên các nhà vi sinh vì hai kỹ thuật thực hiện theo nguyên lý cũng như quy trình thực hiện hoàn toàn khác nhau. Tuy nhiên, mỗi kỹ thuật lại có những điểm mạnh riêng và không ai có thể phủ nhận cho đến hiện nay chưa có kỹ thuật nào có thể thay thế kỹ thuật nuôi cấy vi khuẩn thường quy, ít nhất là ở những nước đang phát triển như Việt nam. Bởi vì, multiplex realtime PCR cũng có nhiều nhược điểm đó là kết quả kỹ thuật nuôi cấy có thể định danh rất nhiều loại vi khuẩn (khác với

multiplex realtime PCR chỉ phát hiện các vi khuẩn được chuẩn bị gen đích) cũng như có kháng sinh đồ rõ ràng đồng thời với nhiều loại vi khuẩn đó. Ngoài ra chưa kể đến lỗi khi thực hiện kỹ thuật multiplex realtime PCR dẫn đến sai lệch kết quả cũng như giá thành khá cao. Tuy nhiên, chúng ta cũng phải thừa nhận rằng multiplex realtime PCR đặc biệt có giá trị ở những bệnh nhân VPLQTM nhưng kết quả nuôi cấy âm tính và những bệnh nhân đã sử dụng kháng sinh trước đó. Trong trường hợp, nuôi cấy vi khuẩn thông thường bệnh phẩm hô hấp mà các dấu hiệu lâm sàng rõ ràng và nặng nề đe dọa tính mạng người bệnh thì multiplex realtime PCR là một gợi ý sử dụng kháng sinh có ý nghĩa cho các bác sỹ lâm sàng.

Nghiên cứu của chúng tôi không phải là nghiên cứu đầu tiên ở Việt nam cũng như trên thế giới thực hiện với mục tiêu so sánh tỷ lệ phát hiện căn nguyên vi khuẩn gây bệnh giữa hai kỹ thuật multiplex realtime PCR và nuôi cấy truyền thống trên bệnh phẩm đường hô hấp. VPLQTM luôn có khả năng cao dẫn đến nhiễm khuẩn huyết và sốc nhiễm khuẩn khi căn nguyên gây bệnh là các vi khuẩn đa kháng thuốc, vì vậy việc chẩn đoán nhanh chóng và điều trị kháng sinh theo kinh nghiệm phù hợp sớm có tầm quan trọng then chốt để cải thiện tình trạng lâm sàng đối với VPLQTM<sup>135</sup>. Riêng đối với nhiễm khuẩn nặng hoặc sốc nhiễm khuẩn thì việc sử dụng kháng sinh trong vòng một giờ đầu là một trong những hướng dẫn điều trị chuẩn nhằm sớm kiểm soát tình trạng sốc, cải thiện tỷ lệ tử vong. Mặt khác, việc điều trị kháng sinh sớm theo kinh nghiệm để điều trị sốc nhiễm khuẩn dẫn đến lựa chọn kháng sinh không phù hợp chiếm một phần ba các trường hợp<sup>6</sup>, và điều này làm gia tăng đáng kể tỷ lệ tử vong cũng như vi khuẩn kháng thuốc trong thời gian nằm viện. Vì vậy, trong bệnh lý nhiễm khuẩn nặng đặc biệt là sốc nhiễm khuẩn thì bất cứ phương pháp nào nhanh chóng tìm ra căn nguyên gây bệnh và giảm tỷ lệ tử vong (cho dù là có thể chỉ về mặt lý thuyết) cũng nên được xem xét áp dụng.

Một nghiên cứu quan sát thí điểm của Baudel và cộng sự (2014) tại Pháp với mục tiêu chính là so sánh khả năng phát hiện căn nguyên vi khuẩn gây viêm phổi ở những bệnh nhân tại đơn vị chăm sóc tích cực. Với mỗi căn nguyên vi khuẩn thì multiplex realtime PCR đều phát hiện với tỷ lệ cao hơn nuôi cấy có ý nghĩa thống kê (multiplex realtime PCR 66%, nuôi cấy chỉ 40% với  $p < 0,001$ ). Ở những bệnh nhân có sử dụng kháng sinh trước đó thì khả năng phát hiện vi khuẩn của multiplex realtime PCR còn hơn nuôi cấy rất nhiều (multiplex realtime PCR 66%, nuôi cấy chỉ 23%,  $p < 0,001$ )<sup>6</sup>.

Việc thường xuyên thiếu kết quả nuôi cấy vi khuẩn một cách chính xác và kịp thời ở những bệnh nhân VPLQTM là một trở ngại lớn đối với việc chỉ định kháng sinh phù hợp. Đa số các bệnh nhân này thường được chỉ định kháng sinh phổ rộng theo kinh nghiệm trong khi chờ đợi kết quả nuôi cấy dịch phế quản, nhưng thường kết quả chậm và hoặc âm tính hoặc không thể khẳng định vi khuẩn gây bệnh nên việc sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử là multiplex realtime PCR đã được đưa vào nghiên cứu từ những năm đầu thế kỷ XXI. Mặt khác, ngoài định tính, ngoài việc phát hiện một loại vi khuẩn trong mẫu bệnh phẩm, multiplex realtime PCR đã phát triển định lượng nhiều loại DNA của nhiều loại vi khuẩn và nồng độ DNA của vi khuẩn có ban đầu trong mỗi ml dịch phế quản là công cụ giúp cho các bác sỹ lâm sàng có thể thuận tiện lựa chọn kháng sinh phổ hẹp, điều trị trúng đích, cải thiện sớm kết cục lâm sàng người bệnh.

#### *4.2.1.2. So sánh tỷ lệ phát hiện đồng nhiễm vi khuẩn giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy*

Ưu điểm chính của multiplex realtime PCR là cho kết quả nhanh chóng cho phép các bác sỹ lâm sàng chỉ định kháng sinh sớm điều trị nhắm đến các căn nguyên vi khuẩn hơn là nuôi cấy thường quy. Tuy nhiên, để kết luận chính xác căn nguyên gây bệnh hay giải thích kết quả multiplex realtime PCR

cần phối hợp lâm sàng, đặc biệt khi kết quả đồng nhiễm nhiều loại vi khuẩn hoặc khi kết quả nuôi cấy cũng như multiplex realtime PCR khác nhau hay không đồng thuận.

Phát hiện vi khuẩn dựa trên kết quả multiplex realtime PCR đôi lúc có thể chỉ là vi khuẩn cư trú chứ không phải là căn nguyên gây bệnh, đây là một nhược điểm của multiplex realtime PCR. Thêm nữa, mặc dù có khả năng phát hiện gen kháng thuốc nhưng không phản ánh đầy đủ tình trạng kháng tất cả các nhóm kháng sinh như kháng sinh đồ hoặc đôi lúc vi khuẩn mang gen kháng kháng sinh nhưng trên thực tế không biểu hiện kháng kháng sinh đó (kiểu hình). Do đó, thực tế lâm sàng nên sử dụng bổ sung cả hai phương pháp chẩn đoán để tận dụng ưu điểm của từng phương pháp. multiplex realtime PCR tỏ ra hiệu quả khi phát hiện được những vi khuẩn đã bị tổn thương, bị bỏ đói có thể còn sống nhưng không thể hồi phục được trong những môi trường nuôi cấy truyền thống, tuy nhiên chúng có thể được kích hoạt bằng điều trị kháng sinh không phù hợp và vẫn giữ được khả năng gây bệnh. Mặc dù multiplex realtime PCR phát hiện thêm nhiều âm tính giả và dương tính giả so với nuôi cấy vi khuẩn thông thường, nhưng nên tiến hành hai phương pháp song song vì nuôi cấy vi khuẩn luôn cần thiết vì cung cấp nhiều dữ liệu vi sinh tin cậy<sup>136</sup>.

#### *4.2.1.2.1. So sánh tỷ lệ phát hiện một loại vi khuẩn giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy*

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ phát hiện một loại vi khuẩn gây bệnh của multiplex realtime PCR thấp hơn nuôi cấy thường quy, kết quả này được thể hiện ở bảng 3.11 (tỷ lệ phát hiện của multiplex realtime PCR là 31,5%- nuôi cấy 49%). Điều này cũng dễ hiểu vì do multiplex realtime PCR có độ nhạy cao nên tỷ lệ phát hiện đồng nhiễm nhiều loại vi khuẩn sẽ cao hơn một loại vi khuẩn. Cũng có thể giải thích tình trạng nhiễm nhiều loại vi khuẩn



trên bệnh nhân VPBV, VPLQTM ở các đơn vị Hồi sức tích cực khá phổ biến mà chỉ có thể làm theo phương pháp sinh học phân tử mới có thể biết được điều đó.

#### 4.2.1.2.2. So sánh tỷ lệ phát hiện nhiều vi khuẩn giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy

Trên thế giới cũng như ở Việt nam, có rất ít nghiên cứu bàn luận về việc phát hiện ra nhiều loại vi khuẩn trong cùng một lần thực hiện kỹ thuật nuôi cấy truyền thống hoặc multiplex realtime PCR ở bệnh nhân VPBV, VPLQTM. Với kỹ thuật nuôi cấy vi khuẩn thường quy đã có từ rất lâu thì việc có kết quả nuôi cấy ra nhiều loại vi khuẩn (sau khi đã loại trừ tạp nhiễm) đã được biết rất rõ ràng. Còn multiplex realtime PCR với độ nhạy quá cao thì tỷ lệ phát hiện đồng nhiễm nhiều vi khuẩn trong cùng một mẫu bệnh phẩm cũng là điều dễ hiểu. Bảng 3.12 và bảng 3.13 cho thấy multiplex realtime PCR phát hiện tỷ lệ đồng nhiễm 2 loại vi khuẩn; 3 loại vi khuẩn ở trong nghiên cứu và ở bất cứ cặp đồng nhiễm nào thì multiplex realtime PCR đều có khả năng phát hiện cao hơn nuôi cấy thường quy. Nghiên cứu của chúng tôi không có mẫu nào phát hiện ra 4 hay cả 5 vi khuẩn trong một mẫu nghiên cứu.

Đến nay những báo cáo mới nhất về phát hiện đồng nhiễm ở bệnh nhân có VPBV, VPLQTM sau nhiễm covid 19 tại các khoa Hồi sức cấp cứu cho thấy ngoài việc đồng nhiễm vi khuẩn và virus thì còn cho biết tỷ lệ đồng nhiễm giữa các vi khuẩn thường gặp. Mario Karolyi và cộng sự ở Áo (2021), nuôi cấy phát hiện đồng nhiễm 25%, multiplex realtime PCR phát hiện đồng nhiễm 28,3%, các vi khuẩn thường gặp nhất là *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*<sup>137</sup>. Nghiên cứu ở Romani (2022) đã phát hiện ở nhóm bệnh nhân có dùng kháng sinh điều trị covid 19 trước khi xuất hiện viêm phổi thì tỷ lệ đồng nhiễm 2 loại vi khuẩn khi nuôi cấy chỉ là 9,7%, multiplex realtime PCR là 29,2%; tỷ lệ đồng nhiễm nhiều

hơn 2 loại vi khuẩn ở nuôi cấy là 2,8%, còn multiplex realtime PCR 11,1% . Các loại vi khuẩn thường gặp đồng nhiễm trong nghiên cứu này là *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* <sup>138</sup>. Trong một nghiên cứu gần đây từ Bỉ, 40% bệnh nhân bị đồng nhiễm *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* và *Moraxella catarrhalis* là vi khuẩn thường được tìm thấy nhất <sup>139</sup>. Tuy nhiên, một nghiên cứu ở Đức cho biết sự xuất hiện đồng nhiễm vi khuẩn chỉ 34%. Một số các cuộc điều tra khác cho thấy phần lớn bệnh nhân đồng nhiễm với *Klebsiella spp* và *Escherichia coli* hơn là *Haemophilus influenzae* <sup>140</sup>. Sự khác biệt này có thể do điều kiện bệnh viện khác nhau từng khu vực, nền kinh tế cũng như bệnh nhân có sẵn các bệnh lý nền hoặc nhiễm các chủng covid khác nhau <sup>138</sup>.

Cho dù bất kỳ nghiên cứu nào, số liệu đều cho thấy multiplex realtime PCR có khả năng phát hiện vi khuẩn tốt hơn nuôi cấy thường quy nhưng do những lý do đã trình bày ở trên thì multiplex realtime PCR chỉ là phương pháp thêm vào chứ chưa thể thay thế hoàn toàn được nuôi cấy vi khuẩn.

#### **4.2.2. Sự phù hợp kết quả giữa multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy đối với 5 loại vi khuẩn gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy**

Với các gen đích nghiên cứu đang sử dụng trong kỹ thuật multiplex realtime PCR phát hiện 5 loại vi khuẩn gây VPBV, VPLQTM, khi so sánh với kết quả nuôi cấy vi khuẩn thường quy (Bảng 3.14), chúng tôi nhận thấy trong 23 bệnh nhân có kết quả nuôi cấy là *K.pneumoniae* thì có 3 bệnh nhân (BN có mã số 62, 63, 149) đều cho kết quả multiplex realtime PCR là *A.baumannii*. Đặc biệt đối với *K.pneumoniae* tỷ lệ dương tính không phù hợp cao nhất trong 5 loại vi khuẩn. Đối với *A.baumannii*, trong số 42 bệnh nhân có kết quả nuôi cấy dương tính thì có 2 bệnh nhân có kết quả multiplex

realtime PCR âm tính, có nghĩa là không phát hiện một loại vi khuẩn nào trong mẫu bệnh phẩm (bệnh nhân có mã số 49, 58). Còn lại với *E.coli*, *P.aeruginosa* và *S.aureus* kết quả multiplex realtime PCR và nuôi cấy luôn đồng thuận.

Hou (2020) ở Trung Quốc cho rằng sự đồng thuận kết quả chung giữa 2 kỹ thuật là 50% (17/34 mẫu), trong đó nuôi cấy thường quy dương tính đồng thuận với multiplex realtime PCR 100%; nuôi cấy thường quy âm tính đồng thuận multiplex realtime PCR 19%. Trong nghiên cứu của Hou cũng gặp một trường hợp nuôi cấy dương tính nhưng PCR âm tính và một mẫu cùng chứa hai loài vi khuẩn khác nhau, điều đó được Hou giải thích có thể có sự tương tác giữa các vi khuẩn làm ảnh hưởng đến kết quả<sup>134</sup>. Collin (2020) ở Mỹ đã công bố trong 175 mẫu thì có 61 mẫu có sự đồng thuận giữa nuôi cấy và multiplex realtime PCR; có một số mẫu multiplex realtime PCR dương tính (phát hiện các mẫu gen vẫn tồn tại sau khi điều trị thích hợp) trong khi nuôi cấy âm tính, điều đó một lần nữa chứng tỏ nuôi cấy chỉ phát hiện được vi khuẩn sống<sup>136</sup>. Và cuối cùng để hạn chế tỷ lệ “bỏ sót” vi khuẩn bởi PCR và hiệu suất phát hiện có thể đạt được ngưỡng chấp nhận được, các nhà nghiên cứu trên thế giới đều đồng thuận nên tạo ra những bộ kit PCR sàng lọc tập trung vào những nhóm bệnh cụ thể, ví dụ như VPLQTM mà các tác nhân gây bệnh thường gặp nhất, đây cũng là ý tưởng phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi<sup>134,141,142</sup>.

Cũng để tìm kiếm một minh chứng cho bộ kit multiplex realtime PCR thương mại nhằm phát hiện 8 vi khuẩn gây VPLQTM và 29 gen kháng kháng sinh, Bogaerts và các nhà khoa học Bỉ (2012) cũng thấy có tỷ lệ phát hiện âm tính giả đối với *E.coli* và 7,1% với *S.aureus*. Sau khi giải trình tự gen ở những chủng vi khuẩn này nhóm nghiên cứu đã phát hiện có hai lý do chính gây nên tình trạng âm tính giả: một là vi khuẩn đó không có gen đích (trường hợp đối

với *E.coli*, thiếu gen *uilA*), hai là có đột biến gen đích ở dẫn đến không phát hiện được vi khuẩn (trường hợp đối với *S.aureus* có 3 vị trí đột biến). Đây là phát hiện khá thú vị trong nghiên cứu này. Thêm nữa tác giả cũng thấy khi tiến hành nhân bản trộn nhiều gen trong cùng một lần chạy có thể làm tăng nồng độ khuếch đại và dẫn đến tình trạng dương tính giả. Tuy nhiên, nghiên cứu cũng khẳng định tỷ lệ này rất thấp <sup>135</sup>.

#### **4.2.3. Giá trị chẩn đoán của multiplex realtime PCR với từng loại vi khuẩn trong viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy**

Trong kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ số mẫu nuôi cấy dương tính của vi khuẩn thực hiện ở cả lần xét nghiệm thì *Escherichia coli* là thấp nhất (07 bệnh nhân), cao nhất là *Acinertobacter baumannii* (54 bệnh nhân). Nhóm cầu khuẩn Gram dương (*Staphylococcus aureus*) cho kết quả nuôi cấy dương tính 5 bệnh nhân. Điểm quan trọng hơn cả là các giá trị chẩn đoán của multiplex realtime PCR đối với từng loại vi khuẩn gây VPBV, VPLQTM cũng được thể hiện trong kết quả ở bảng 3.15. Đối với 3 loại vi khuẩn *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* đều có độ nhạy 100%; giá trị dự đoán âm tính là 100% và chỉ số khả dĩ âm tính bằng 0. Điều đó chứng tỏ nếu có 3 loại vi khuẩn này trong dịch phế quản của bệnh nhân thì chắc chắn multiplex realtime PCR sẽ phát hiện được. Ngược lại nếu kết quả multiplex realtime PCR của 3 vi khuẩn này âm tính thì chắc chắn nguyên nhân gây VPBV, VPLQTM không phải do 3 vi khuẩn này, chỉ số khả dĩ âm tính (LR-) cũng khẳng định điều đó.

Collin cũng cho kết quả có khác chút ít so với nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ âm tính thật và dương tính thật giữa nuôi cấy và multiplex realtime PCR của các vi khuẩn *Acinertobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* và *Pseudomonas aeruginosa* đều đạt 100% <sup>136</sup>.

Kết quả ở bảng 3.15 cũng cho thấy chỉ số khả dĩ dương (LR+) của 2 loại vi khuẩn  $\geq 2$  (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), có nghĩa là nếu multiplex realtime PCR dương tính thì khả năng VPBV, VPLQTM do *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* rất cao. Cuối cùng là chỉ số Kappa cho biết tỷ lệ đồng thuận trong chẩn đoán 5 loại vi khuẩn gây VPBV, VPLQTM giữa hai kỹ thuật nuôi cấy và multiplex realtime PCR là 0,607 với  $p=0,046$ , với chỉ số này, nghiên cứu đã chỉ ra rằng tỷ lệ đồng thuận trong kết quả căn nguyên vi khuẩn gây VPBV, VPLQTM giữa kỹ thuật multiplex realtime PCR và nuôi cấy thường quy ở mức khá tốt và có ý nghĩa thống kê.

#### **4.2.4. Giá trị chẩn đoán của multiplex realtime PCR trong viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy do 5 loại vi khuẩn gây bệnh thường gặp**

Nhằm mục tiêu đưa kỹ thuật multiplex realtime PCR áp dụng vào thực tiễn để chẩn đoán và phát hiện nhanh 5 loại vi khuẩn thường gặp gây VPBV, VPLQTM, chúng tôi đã tính toán độ nhạy chung của kỹ thuật multiplex realtime PCR dựa trên các mẫu bệnh phẩm có kết quả nuôi cấy thường quy dương tính, còn độ đặc hiệu của kỹ thuật cũng được tính toán dựa trên các mẫu có kết quả nuôi cấy thường quy âm tính. Độ nhạy của multiplex realtime PCR trong nghiên cứu của chúng tôi khá cao 97,8%; độ đặc hiệu 24,6%; giá trị dự đoán dương tính 67,7%; giá trị dự đoán âm tính 87,5% (Bảng 3.16) với  $p < 0,05$  (CI 95% 0; 618- 0,738).

Có rất nhiều nghiên cứu về giá trị chẩn đoán của multiplex realtime PCR trong các bệnh lý nhiễm khuẩn từ khoảng một thập kỷ nay và đặc biệt các nghiên cứu về giá trị chẩn đoán căn nguyên vi khuẩn gây VPBV, VPLQTM được báo cáo ngày càng nhiều, cho dù có thể sử dụng các gen đích khác nhau hay mục đích các nghiên cứu khác nhau, nhưng đều đồng thuận khẳng định multiplex realtime PCR có độ nhạy rất cao trên 90%<sup>134, 136, 143, 144</sup>. Ở Pháp có hai nghiên cứu đáng chú ý trong năm 2020, cũng sử dụng cùng

một loại kit thương mại PCR phát hiện 20 căn nguyên vi sinh vật gây VPLQTM thường gặp và 19 gen kháng kháng sinh. Nghiên cứu thứ nhất của Peiffer- Smadja cho kết quả multiplex realtime PCR mang lại độ nhạy là 80% (khoảng tin cậy CI 95%; 71-88%), độ đặc hiệu 99% (khoảng tin cậy CI 95%; 99-100%), giá trị dự đoán dương tính 87% (khoảng tin cậy CI 95%; 89-92%), giá trị dự đoán âm tính 99% (khoảng tin cậy CI 95%; 90- 99%). Nhóm nghiên cứu cũng khẳng định độ nhạy của multiplex realtime PCR rất không đồng nhất giữa các vi khuẩn, độ nhạy cao hơn cho vi khuẩn gram âm (90%) so với cầu khuẩn gram dương (62%) với  $p= 0,005$  <sup>67</sup>. Nghiên cứu này cho kết quả không giống như nghiên cứu của chúng tôi, khả năng phát hiện vi khuẩn của kỹ thuật nuôi cấy và multiplex realtime PCR gần tương đương nhau với từng loại vi khuẩn, với riêng từng loại vi khuẩn đôi khi thấy khả năng phát hiện của kỹ thuật nuôi cấy còn cao hơn multiplex realtime PCR, phải chăng kỹ thuật nuôi cấy của nghiên cứu tốt hơn của chúng tôi hoặc số bệnh nhân dùng kháng sinh trước khi nuôi cấy của họ ít hơn của chúng tôi. Ngoài ra, một lý do nữa cũng có thể giải thích cho sự khác biệt này đó là cách lấy bệnh phẩm trong nghiên cứu chỉ lấy dịch rửa phế quản BAL và lấy bệnh phẩm bằng catheter vô khuẩn qua nội soi phế quản (plugged telescoping catheter- PTC) <sup>67</sup>. Nghiên cứu thứ hai ở Pháp trong năm 2020 mà chúng tôi muốn nhắc đến là của Luyt, cũng với mục đích so sánh giá trị chẩn đoán căn nguyên gây VPLQTM của multiplex realtime PCR với nuôi cấy thường quy (được coi là tiêu chuẩn vàng), kết quả multiplex realtime PCR có độ nhạy chung cho tất cả các căn nguyên gây bệnh là 77,4%; độ đặc hiệu 14,3%; giá trị dự đoán dương tính 91,5%; giá trị dự đoán âm tính 5%. Một số hạn chế trong nghiên cứu được thừa nhận, đây là một nghiên cứu đơn trung tâm, số lượng BN ít cần nghiên cứu thêm; có nên sử dụng nội soi phế quản ống mềm để lấy bệnh

phẩm BAL hay không vì không có sẵn trên toàn cầu và không nên sử dụng kỹ thuật này như là biện pháp để chẩn đoán VPLQTM<sup>145</sup>.

Chỉ hai nghiên cứu cũng thấy những kết quả giá trị multiplex realtime PCR trong chẩn đoán VPBV, VPLQTM rất khác nhau, tuy nhiên multiplex realtime PCR đều cho thấy khả năng phát hiện vi khuẩn gây bệnh rất cao và nếu sử dụng các gen kháng kháng sinh là gen đích để phát hiện vi khuẩn thì đây là một trong những kỹ thuật hứa hẹn khá triển vọng và giúp ích nhiều cho lâm sàng.

### **4.3. Phân tích vai trò của multiplex realtime PCR trong điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy**

#### **4.3.1. Sử dụng kháng sinh phù hợp**

Liệu pháp kháng sinh sớm và thích hợp là chìa khóa để cải thiện tiên lượng, giảm tác dụng phụ và giảm chi phí điều trị ở bệnh nhân VPBV, VPLQTM. Việc xác định các chủng vi khuẩn phân lập từ bệnh phẩm đường hô hấp bằng nuôi cấy thông thường mất 2-3 ngày. Để khắc phục sự chậm trễ về mặt kỹ thuật, cần có các chiến lược mới với hiệu quả và độ nhạy cao để đưa ra chẩn đoán nguyên nhân đối với VPBV, VPLQTM. Giá trị của kỹ thuật PCR độc lập trong việc chẩn đoán những nhiễm khuẩn nặng đe dọa tính mạng như nhiễm khuẩn huyết, nhiễm khuẩn thần kinh đã được nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh rõ. Tuy nhiên, cho đến hiện tại các nghiên cứu chứng minh giá trị PCR trên mẫu bệnh phẩm đường hô hấp ở bệnh nhân nghi ngờ VPBV, VPLQTM còn hạn chế.

Có lẽ hiệu quả điều trị VPBV, VPLQTM khi sử dụng multiplex realtime PCR làm hướng dẫn thì đầu tiên và quan trọng nhất là sự thay đổi kháng sinh khi sử dụng kháng sinh theo kinh nghiệm, đó là giảm leo thang và sử dụng kháng sinh không phù hợp. Trước tình hình thực tế trong nghiên cứu của chúng tôi nói riêng và ở Việt nam nói chung tính đến thời điểm hiện tại,

khi có kết quả multiplex realtime PCR thì chủ yếu định hướng có sử dụng colistin hay là không mà thôi, tức là nếu kết quả cho định hướng khả năng gây bệnh là nhóm trực khuẩn gram âm kết hợp với tình trạng sốc (nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng) thì nên xuống thang colistin ngay. Còn nếu là cầu khuẩn gram dương (*Staphylococcus aureus* kháng methicillin) thì sẽ sử dụng vancomycin hoặc linezolid. Bảng 3.17 cho thấy tình trạng sử dụng kháng sinh hợp lý trong nghiên cứu của chúng tôi thời điểm có kết quả multiplex realtime PCR, vẫn có đến 29 bệnh nhân (34,0%) tại thời điểm đó sử dụng kháng sinh không phù hợp. Điều đó được lý giải rất nhiều lý do, do điều kiện cung ứng thuốc của mỗi bệnh viện khác nhau, do điều kiện kinh tế của mỗi gia đình bệnh nhân quá eo hẹp.. dẫn đến tình trạng từ chối điều trị và cho bệnh nhân về trong lúc bệnh vẫn có thể còn có thể cứu chữa.

Theo Celine, multiplex realtime PCR có thể dẫn đến sự thay đổi sử dụng kháng sinh theo kinh nghiệm trong 77% đợt VPLQTM và giảm leo thang kháng sinh đến gần một nửa số bệnh nhân. Điều trị kháng sinh có hướng dẫn của multiplex realtime PCR có xu hướng đầy đủ và phù hợp hơn so với điều trị kháng sinh theo kinh nghiệm. Kết quả vi khuẩn dương tính từ multiplex realtime PCR thường cao hơn nuôi cấy thường quy nên rất thuận lợi khi sử dụng. Tuy nhiên, tác giả cũng rất thận trọng khi diễn giải kết quả khi độ nhạy của multiplex realtime PCR quá cao, đó là kỹ thuật có thể phát hiện các mẫu DNA của các vi khuẩn đã chết không liên quan đến VPLQTM thực tế, điều này sẽ dẫn đến việc điều trị quá mức. Tương tự, việc phân biệt vi khuẩn cư trú hay thực sự là vi khuẩn gây bệnh từ kết quả multiplex realtime PCR cũng là một thách thức và nó cần một giải thích phù hợp dựa trên các triệu chứng lâm sàng. Hiện nay, trên thế giới chưa có sự đồng thuận nhất trí nào cho ngưỡng chẩn đoán khi so sánh tương quan giữa nuôi cấy định lượng (đơn vị cfu/ml) và quantitative multiplex realtime PCR (đơn vị bản sao



DNA/ml), câu hỏi này vẫn đang được nghiên cứu <sup>143</sup>, chính vì vậy các bác sỹ lâm sàng nên cân nhắc ngưỡng chẩn đoán của nuôi cấy truyền thống để giải thích kết quả vi khuẩn của kỹ thuật sinh học phân tử có độ nhạy rất cao này.

#### ***4.3.2. Thời gian thở máy, thời gian điều trị, tỷ lệ tử vong do viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy của hai nhóm bệnh nhân trong nghiên cứu***

Trong nghiên cứu của chúng tôi, thời gian thở máy trung bình giữa hai nhóm có sự khác biệt với  $p=0,049$  (nhóm nghiên cứu là  $11,37 \pm 6,36$  ngày; nhóm chứng  $13,12 \pm 9,27$  ngày). Ngoài ra, thời gian nằm tại khoa Hồi sức tích cực và thời gian nằm viện giữa hai nhóm cũng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  (Bảng 3.18).

Tỷ lệ tử vong chung ở cả hai nhóm là 41,7%; nhóm nghiên cứu là 34,7%; nhóm chứng là 48,8%, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với  $p=0,022$ . Tỷ lệ tử vong do VPLQTM giữa hai nhóm nghiên cứu không có sự khác biệt thực sự  $p=0,141$ . Tương tự như vậy, tỷ lệ tử vong do VPLQTM ở các ngày thứ 7, ngày thứ 14, ngày thứ 28 không thực sự khác biệt rõ rệt (Bảng 3.19).

Các phương pháp sinh học phân tử mới ra đời trong thực hành lâm sàng hiện nay đều có mục đích rút ngắn thời gian xác định căn nguyên gây bệnh, tìm thời điểm thích hợp để điều trị và cuối cùng là để giảm tỷ lệ tử vong. Tuy nhiên, cho đến thời điểm hiện tại trên thế giới có rất ít bằng chứng được công bố lợi ích và tiềm năng rõ rệt trên lâm sàng khi áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử này. Về tỷ lệ tử vong khi sử dụng multiplex realtime PCR, các nghiên cứu đều có sự khác biệt, mà không có rõ ràng xu hướng ủng hộ. Hầu hết các nghiên cứu mà có sự khác biệt rõ rệt về tỷ lệ tử vong, thời gian nằm viện do nhiễm trùng thì đều có sự kết hợp giữa việc sử dụng multiplex realtime PCR và chiến lược quản lý sử dụng kháng sinh chặt chẽ. Đặc biệt khi tìm hiểu các

yếu tố liên quan đến tỷ lệ tử vong thì kết quả multiplex realtime PCR và sử dụng kháng sinh phù hợp là 2 yếu tố độc lập dự báo gia tăng tỷ lệ tử vong ở các bệnh lý nhiễm trùng<sup>146</sup>. Kết quả này cũng tương tự kết quả nghiên cứu của chúng tôi.

Pouly và cộng sự (2020) tổng kết và so sánh tiên lượng giữa bệnh nhân có VPLQTM và không VPLQTM nằm điều trị tại 5 đơn vị Hồi sức tích cực tại Pháp, nhóm nghiên cứu đưa ra kết quả tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân VPLQTM là 38,1%; thời gian thở máy trung bình là 18 ngày(11- 31), thời gian nằm viện trung bình là 31 ngày (18-60). Điều quan trọng là có sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê giữa nhóm bệnh nhân VPLQTM và nhóm bệnh nhân không VPLQTM<sup>147</sup>. Bonine và các cộng sự ở Hy Lạp (2019) đã nhấn mạnh trong nghiên cứu của mình việc VPLQTM mà các căn nguyên do vi khuẩn đa kháng và sử dụng kháng sinh không phù hợp, chậm trễ đồng thời làm tăng chi phí điều trị cũng như tiên lượng BN sẽ rất xấu. Nếu điều trị kháng sinh đúng thời điểm thì cho dù có nhiễm các trực khuẩn đa kháng gram âm thời gian sử dụng kháng sinh, thời gian điều trị tại bệnh viện, chi phí cho đợt điều trị cũng giảm một cách có ý nghĩa (nhóm sử dụng kháng sinh phù hợp đúng thời điểm: thời gian sử dụng kháng sinh trung bình chỉ 8,2 ngày- thời gian nằm điều trị tại bệnh viện trung bình là 8,7 ngày); (nhóm sử dụng không đúng thời điểm: thời gian sử dụng kháng sinh 12,7 ngày- thời gian nằm tại bệnh viện 13,6 ngày- chi phí điều trị trung bình 32,518 đô la). Tuy nhiên, điều đặc biệt ở đây là tỷ lệ tử vong ở bệnh viện hay về nhà giữa hai nhóm lại không khác biệt rõ rệt<sup>148</sup>. Vì vậy, cho dù không cải thiện rõ về tỷ lệ tử vong, nhưng nghiên cứu cũng làm nổi bật lên việc xác định căn nguyên vi khuẩn cũng giúp lựa chọn các kháng sinh phù hợp nhanh chóng cải thiện lộ trình điều trị, tiết kiệm chi phí.

**Bảng 4.1.** So sánh kết quả điều trị của nhóm can thiệp với các nghiên cứu ở Việt nam trong thời gian gần đây

Tác giả nghiên cứu	Năm nghiên cứu	Thời gian nằm khoa HS (ngày)	Thời gian nằm viện (ngày)	Thời gian thở máy (ngày)	TLTV do VPLQTM
Hà Sơn Bình	2015 <sup>30</sup>	19,5 ± 7,3	-	17,7 ± 7,0	42%
Vũ Đình Phú	2017 <sup>14</sup>	25 (19- 37)	31 (22-46)	21(14-28}	35,1%
Hoàng Khánh Linh	2018 <sup>28</sup>	14,92 ± 8,02	-	10,79 ± 5,7	34,6%
Chúng tôi	2021	17,80 ± 14,16	17,85 ± 14,19	11,37± 6,36	21,5%

Khi so sánh các báo cáo về VPLQTM gần đây, chúng tôi thấy kết quả các nghiên cứu tương đồng (Bảng 4.1) với những nghiên cứu trong những năm gần đây tại khoa Điều trị tích cực bệnh viện Bạch mai của Hà Sơn Bình (2015), Hoàng Khánh Linh (2018). Riêng báo cáo của Vũ Đình Phú (2017) là một nghiên cứu có quy mô khá lớn và có thể nói là một nghiên cứu đại diện cho tình hình VPBV, VPLQTM ở Việt Nam, nghiên cứu cũng cho thấy không có sự khác biệt rõ rệt về ngày nằm viện, ngày nằm điều trị tại các khoa hồi sức cấp cứu, ngày thở máy. Tuy nhiên, tỷ lệ tử vong do VPLQTM chúng ta có thể thấy giảm dần theo thời gian, đặc biệt trong nghiên cứu của chúng tôi so với các nghiên cứu khác giảm được đáng kể: Hà Sơn Bình (2015) tỷ lệ tử vong do VPLQTM là 42%; Hoàng Khánh Linh (2018) 34,6%; chúng tôi (2021) 21,5%. Điều đáng nói là các đề tài này được nghiên cứu tại các bệnh viện tuyến trung ương, nơi có đầy đủ các trang thiết bị, kháng sinh mới nhất điều trị nhiễm khuẩn bệnh viện và triển khai sớm nhất các phương pháp

phòng ngừa chuẩn nhiễm khuẩn bệnh viện cũng như VPLQTM, phòng xét nghiệm vi sinh hiện đại cùng đội ngũ bác sỹ điều dưỡng nhiều kinh nghiệm. Nghiên cứu của chúng tôi chỉ diễn ra ở bệnh viện tuyến thành phố. Cho đến giờ phút này có lẽ nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu can thiệp quy mô nhất trong các bệnh viện tuyến thành phố Hà Nội, trong quá trình nghiên cứu gặp một số khó khăn như từ gián đoạn việc thu thập mẫu nghiên cứu do bệnh dịch covid, các biện pháp phòng ngừa nhiễm khuẩn chưa được triển khai đúng và đồng bộ, thiếu trang thiết bị vật tư và thiếu thuốc kháng sinh thiết yếu được thanh toán bảo hiểm đã dẫn đến một số bệnh nhân xin về không điều trị nữa làm ảnh hưởng không nhỏ đến kết quả nghiên cứu. Đây cũng là một trong nguyên nhân dẫn đến kết quả nghiên cứu không được như mong muốn. Tuy nhiên, khi so sánh trong nghiên cứu của chúng tôi tỷ lệ tử vong cũng giảm được đáng kể so với nghiên cứu của Hoàng Khánh Linh (2018), đây là con số rất đáng quý để các bác sỹ lâm sàng tin tưởng và nên áp dụng kỹ thuật multiplex realtime PCR để nhằm điều trị tốt hơn cho người bệnh và giảm tỷ lệ tử vong.

#### ***4.3.3. Số bệnh nhân cần áp dụng multiplex realtime PCR để giảm một bệnh nhân tử vong do viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy***

Trong vài thập kỷ trở lại đây, số lượng ngày càng tăng các thử nghiệm, nghiên cứu lâm sàng đã cung cấp cho các bác sỹ nhiều dữ liệu và kết quả. Một số phát hiện đã đóng vai trò quan trọng trong thực hành lâm sàng và thậm chí còn tham gia vào hướng dẫn điều trị. Để tính toán và hiểu rõ giá trị của mỗi loại thuốc, mỗi kỹ thuật và mỗi thử nghiệm lâm sàng, có nhiều tài liệu hướng dẫn tính toán: hiệu quả điều trị của kỹ thuật, các yếu tố có lợi- có hại, cách đánh giá tiềm năng của chúng<sup>149</sup>. Trong nghiên cứu của chúng tôi, điểm bất lợi chính là tỷ lệ tử vong do VPLQTM và nếu tính toán có sự khác biệt về tỷ lệ tử vong giữa hai nhóm nghiên cứu thì multiplex realtime PCR

giúp cho bệnh nhân VPLQTM giảm nguy cơ tử vong tuyệt đối (ARR). Chính căn cứ vào nguy cơ tử vong tuyệt đối này đã tính toán số lượng bệnh nhân trung bình (NNT) cần sử dụng kỹ thuật multiplex realtime PCR để một bệnh nhân được hưởng lợi ích của kỹ thuật, và ở đây là sự sống sót, số bệnh nhân trung bình này thường được làm tròn đến số nguyên tiếp theo<sup>149, 150</sup>. Tuy nhiên, cả ARR và NNT đều kém nhạy cảm với những thay đổi tỷ lệ nhỏ, vì vậy các nhà dịch tễ đã đưa ra thêm khái niệm giảm nguy cơ tương đối (RRR), nó chính bằng 1 trừ đi nguy cơ hay chính là 1 trừ đi tỷ lệ tử vong do VPLQTM, nếu  $RRR = 0$  (hay  $RR = 1$ ) coi như không có lợi ích gì khi sử dụng kỹ thuật. Với những căn cứ trên, trong nghiên cứu này, cần áp dụng multiplex realtime PCR cho ít nhất 6 bệnh nhân để có thể giảm một bệnh nhân tử vong do VPLQTM (Bảng 3.20).

Tóm lại, thực hiện nghiên cứu trên 242 bệnh nhân, chúng tôi có một nhận xét là việc sử dụng kháng sinh trong điều trị VPLQTM quan trọng nhất vẫn là tiêu diệt được vi khuẩn, đủ liều và đảm bảo ổn định nồng độ trong máu (sử dụng kháng sinh phù hợp). Đó là điều tốt nhất giúp cải thiện tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân VPLQTM. Hiện tại các xét nghiệm cận lâm sàng chúng ta đang sử dụng không có kỹ thuật nào hoàn hảo, multiplex realtime PCR cũng như vậy, là kỹ thuật cũng có những nhược điểm, tuy nhiên nếu phối kết hợp với các dấu hiệu lâm sàng, cận lâm sàng khác thì multiplex realtime PCR cũng có giúp một phần vào công cuộc định hướng vi khuẩn giúp nâng cao tỷ lệ sử dụng kháng sinh phù hợp, giảm được chi phí điều trị do giảm thời gian thở máy, thời gian nằm khoa Hồi sức cấp cứu và thời gian nằm viện.

## KẾT LUẬN

### 1. Giá trị chẩn đoán của multiplex realtime PCR trong viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy do 5 loại vi khuẩn gây bệnh thường gặp:

- Multiplex realtime PCR có khả năng phát hiện vi khuẩn cao hơn nuôi cấy thường quy; Thời gian trả kết quả trung bình thấp hơn nuôi cấy (multiplex realtime PCR là  $8,20 \pm 3,37$  giờ; nuôi cấy là  $52,82 \pm 11,70$  giờ với  $p < 0,001$ ).

- Giá trị chẩn đoán của multiplex realtime PCR đối với từng loại vi khuẩn: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* đều có độ nhạy 100%; giá trị dự đoán âm tính là 100%. Riêng *Acinetobacter baumannii* và *Klebsiella pneumoniae* có độ nhạy tương ứng là 96,3% và 89,3%; giá trị dự đoán âm tính là: 96,0% và 95,2%. Sự đồng thuận multiplex realtime PCR với nuôi cấy ở mức khá tốt (chỉ số Kappa index là 0,607 với  $p = 0,046$ ).

- Giá trị chẩn đoán của multiplex realtime PCR trong viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy cho cả 5 loại vi khuẩn là: độ nhạy 97,8%; độ đặc hiệu 24,6%; giá trị chẩn đoán dương tính 67,7%; giá trị chẩn đoán âm tính 87,3% với  $p < 0,05$ .

### 2. Phân tích vai trò của multiplex realtime PCR trong điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy

- Giảm tỷ lệ sử dụng kháng sinh không phù hợp (Nhóm nghiên cứu 34,0%; nhóm chứng 48,8% với  $p < 0,05$ ).

- Giảm thời gian thở máy (Nhóm nghiên cứu  $11,37 \pm 6,36$  ngày; nhóm chứng  $13,12 \pm 9,27$  ngày với  $p = 0,49$ ).

- Giảm thời gian nằm khoa hồi sức tích cực (Nhóm nghiên cứu  $17,80 \pm 14,16$  ngày; nhóm chứng  $21,51 \pm 11,75$  ngày với  $p = 0,028$ ).

- Giảm thời gian nằm viện (Nhóm nghiên cứu  $17,85 \pm 14,19$  ngày; nhóm chứng  $21,66 \pm 12,00$  ngày với  $p = 0,025$ ).

- Không giảm rõ rệt tỷ lệ tử vong do viêm phổi liên quan thở máy giữa hai nhóm nghiên cứu.

- Cần áp dụng kỹ thuật multiplex realtime PCR cho ít nhất 6 bệnh nhân có thể làm giảm 1 bệnh nhân tử vong do VPLQTM.

## **KIẾN NGHỊ**

1. Với những tiến bộ trong kỹ nguyên khoa học công nghệ, các kỹ thuật sinh học phân tử như multiplex realtime PCR có độ nhạy rất cao, thời gian trả kết quả ngắn sẽ giúp bác sỹ lâm sàng định hướng loại vi khuẩn gây VPBV, VPLQTM, từ đó có chỉ định điều trị phù hợp.
2. Kỹ thuật multiplex realtime PCR tỏ ra có hiệu quả trong việc chẩn đoán sớm căn nguyên gây VPBV, VPLQTM. Kết hợp với các dấu hiệu lâm sàng phù hợp có thể làm tăng tỷ lệ sử dụng kháng sinh phù hợp, giảm thời gian thở máy, giảm thời gian nằm khoa Hồi sức tích cực. Vì vậy, kỹ thuật này nên được áp dụng để chẩn đoán sớm căn nguyên gây VPBV, VPLQM và giúp định hướng điều trị nhằm cải thiện tiên lượng người bệnh.



## **CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Đinh Thị Thu Hương, Bùi Vũ Huy, Đỗ Ngọc Sơn (2019). Đánh giá các yếu tố liên quan tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân viêm phổi thở máy. *Tạp chí y học Việt nam tháng 9/2019*, Tập 482: 124 – 130.
2. Đinh Thị Thu Hương, Bùi Vũ Huy, Đỗ Ngọc Sơn (2019). Khả năng phát hiện vi khuẩn gây bệnh viêm phổi liên quan thở máy thường gặp của phương pháp nuôi cấy thường quy và multiplex realtime PCR. *Tạp chí y học Việt nam tháng 12/2019*, Tập 485: 202 – 205.
3. Đinh Thị Thu Hương, Bùi Vũ Huy, Đỗ Ngọc Sơn (2019). Hiệu quả điều trị viêm phổi thở máy do vi khuẩn gây bệnh thường gặp phát hiện bằng multiplex realtime PCR. *Tạp chí nghiên cứu y học*, số 132, tập 8, tháng 11/2020: 157 – 165.
4. Đinh Thị Thu Hương, Bùi Vũ Huy, Đỗ Ngọc Sơn (2023). Vai trò của multiplex realtime PCR trong theo dõi điều trị viêm phổi liên quan thở máy. *Tạp chí y học Việt Nam tháng 01/2023*, tập 522: 345- 352.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arthur LE, Kizor RS, Selim AG, van Driel ML, Seoane L. Antibiotics for ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016;(10)
2. CDC. *Ventilator- Associated Event (VAE) for use adult location only*. 2020.
3. But A, Yetkin MA, Kanyilmaz D, et al. Analysis of epidemiology and risk factors for mortality in ventilator-associated pneumonia attacks in intensive care unit patients. *Turkish journal of medical sciences*. 2017;47(3):812-816.
4. Karakuzu Z, Iscimen R, Akalin H, Girgin NK, Kahveci F, Sinirtas M. Prognostic risk factors in ventilator-associated pneumonia. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2018;24:1321.
5. Torres A, Niederman MS, Chastre J, et al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia (VAP) of the European Respiratory Society (ERS), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT). *European Respiratory Journal*. 2017;50(3):1700582.
6. Baudel J-L, Tankovic J, Dahoumane R, et al. Multiplex PCR performed of bronchoalveolar lavage fluid increases pathogen identification rate in critically ill patients with pneumonia: a pilot study. *Annals of intensive care*. 2014;4(1):35.

7. BLOT FO, RAYNARD B, CHACHATY E, TANCRÈDE C, ANTOUN S, NITENBERG GR. Value of gram stain examination of lower respiratory tract secretions for early diagnosis of nosocomial pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;162(5):1731-1737.
8. Chastre J, Trouillet J-L, Combes A, Luyt C-E. Diagnostic techniques and procedures for establishing the microbial etiology of ventilator-associated pneumonia for clinical trials: the pros for quantitative cultures. *Clinical Infectious Diseases*. 2010;51(Supplement\_1):S88-S92.
9. Souza-Oliveira AC, Cunha TM, da Silva Passos LB, Lopes GC, Gomes FA, de Brito Röder DVD. Ventilator-associated pneumonia: the influence of bacterial resistance, prescription errors, and de-escalation of antimicrobial therapy on mortality rates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2016;20(5):437-443.
10. Othman AA, Abdelazim MS. Ventilator-associated pneumonia in adult intensive care unit prevalence and complications. *The Egyptian Journal of Critical Care Medicine*. 2017;5(2):61-63.
11. Ali HS, Khan FY, George S, Shaikh N, Al-Ajmi J. Epidemiology and outcome of ventilator-associated pneumonia in a heterogeneous ICU population in Qatar. *BioMed research international*. 2016;2016
12. Vu DP. *Burden, Etiology and Control of Hospital Acquired Infections in Intensive Care Units in Vietnam*. The Open University; 2017.
13. Trần Thị Thanh Nga\* TTP, Nguyễn Văn Khôi\*, Lê Phương Mai\*, Ngô Minh Quân\*, Đặng Anh Tuấn\*. Đặc điểm vi khuẩn và đề kháng kháng sinh trong viêm phổi bệnh viện- viêm phổi thở máy tại bệnh viện Chợ rẫy 2015- 2016. *Nội san tháng 12/2017*. 2017;

14. Phu VD, Nadjm B, Duy NHA, et al. Ventilator-associated respiratory infection in a resource-restricted setting: impact and etiology. *Journal of intensive care*. 2017;5(1):69.
15. Ducel G, Fabry J, Nicolle L, Organization WH. Prevention of hospital-acquired infections: a practical guide. 2002;
16. Society AT. Infectious Diseases Society of America: Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:388-416.
17. Stoller J, Snider G, Brantly M, et al. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*. 2005;59(1):36.
18. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, et al. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;63(5):e61-e111.
19. M.B AYP, M.D DCH. Hospital- Acquired Infections due to gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine*. 2010;362:1804-13.
20. Zilberberg M, Nathanson B, Sulham K, Fan W, Shorr A. Impact of inappropriate empiric treatment of acinetobacter baumannii pneumonia and sepsis on hospital mortality. *Chest*. 2016;150(4):114A.
21. Behnia M, Logan SC, Fallen L, Catalano P. Nosocomial and ventilator-associated pneumonia in a community hospital intensive care unit: a retrospective review and analysis. *BMC research notes*. 2014;7(1):232.

22. Giuliano KK, Baker D, Quinn B. The epidemiology of nonventilator hospital-acquired pneumonia in the United States. *American Journal of Infection Control*. 2018/03/01/ 2018;46(3):322-327. doi:[https:// doi.org/ 10.1016/ j.ajic.2017.09.005](https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.09.005)
23. Timsit J-F, Esaied W, Neuville M, Bouadma L, Mourvillier B. Update on ventilator-associated pneumonia. *F1000Research*. 11/29 11/27/accepted 2017;6:2061. doi:10.12688/f1000research.12222.1
24. Chouhdari A, Shokouhi S, Bashar FR, et al. Is a low incidence rate of ventilation associated pneumonia associated with lower mortality? A descriptive longitudinal study in Iran. *Tanaffos*. 2018;17(2):110.
25. Abdelrazik Othman A, Salah Abdelazim M. Ventilator-associated pneumonia in adult intensive care unit prevalence and complications. *The Egyptian Journal of Critical Care Medicine*. 2017/08/01/ 2017;5(2):61-63. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejccm.2017.06.001>
26. Bonell A, Azarrafy R, Huong VTL, et al. A Systematic Review and Meta-analysis of Ventilator-associated Pneumonia in Adults in Asia: An Analysis of National Income Level on Incidence and Etiology. *Clinical Infectious Diseases*. 2018;68(3):511-518. doi:10.1093/cid/ciy543
27. Ding C, Zhang Y, Yang Z, et al. Incidence, temporal trend and factors associated with ventilator-associated pneumonia in mainland China: a systematic review and meta-analysis. *BMC infectious diseases*. 2017;17(1):468.
28. Linh HK. Nghiên cứu đặc điểm viêm phổi liên quan thở máy tại khoa Hồi sức tích cực bệnh viện Bạch Mai giai đoạn từ 2017- 2018. Luận văn bác sỹ chuyên khoa cấp II. 2018;Trường Đại học Y hà nội.
29. Feng DY, Zhou YQ, Zhou M, Zou XL, Wang YH, Zhang TT. Risk Factors for Mortality Due to Ventilator-Associated Pneumonia in a Chinese Hospital: A Retrospective Study. *Med Sci Monit*. Oct 12 2019;25:7660-7665. doi:10.12659/msm.916356

30. Bình; HS. *Nghiên cứu đặc điểm viêm phổi liên quan thở máy tại khoa Hồi sức tích cực bệnh viện Bạch mai giai đoạn 2017- 2018*. Trường Đại học Y Hà nội; 2015.
31. Hayakawa K, Nguyen GB, Nagashima M, et al. Current Epidemiology of Ventilator-associated Pneumonia in an Intensive Care Unit in Vietnam. *Open Forum Infectious Diseases*. Fall 10/04 2017;4(Suppl 1):S632-S633. doi:10.1093/ofid/ofx163.1679
32. Garnacho-Montero J, Gutiérrez-Pizarraya A, Lopez-García I, et al. Pneumonia in mechanically ventilated patients: no diagnostic and prognostic value of different quantitative tracheal aspirates thresholds. *Infectious Diseases*. 2017:1-8.
33. Carvalho EMD, Massarollo PCB, Levin AS, et al. Comparative study of etiological diagnosis of nosocomial pneumonia. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2008;12(1):67-74.
34. Bercault N, Boulain T. Mortality rate attributable to ventilator-associated nosocomial pneumonia in an adult intensive care unit: a prospective case-control study. *Critical care medicine*. 2001;29(12):2303-2309.
35. Rello J. Importance of appropriate initial antibiotic therapy and de-escalation in the treatment of nosocomial pneumonia. *European Respiratory Review*. 2007;16(103):33-39.
36. CDC. Pneumonia (Ventilator-associated [VAP] and non-ventilator-associated Pneumonia [PNEU]) Event 2018;
37. Society AT, America IDSo. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;171(4):388.

38. Koulenti D, Tsigou E, Rello J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2017;36(11):1999-2006.
39. Carvalhaes CG, Castanheira M, Sader HS, Flamm RK, Shortridge D. Antimicrobial activity of ceftolozane–tazobactam tested against Gram-negative contemporary (2015–2017) isolates from hospitalized patients with pneumonia in US medical centers. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2019;94(1):93-102.
40. Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Flamm RK. Frequency and antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria isolated from patients with pneumonia hospitalized in ICUs of US medical centres (2015–17). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(11):3053-3059.
41. Chou C-C, Shen C-F, Chen S-J, et al. Recommendations and guidelines for the treatment of pneumonia in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2019;52(1):172-199.
42. Dehghan F, Zolghadri N, Boostani V, Shafii A, Eftekhaari TE. Resistance of gram negative bacteria in hospital acquired pneumonia: a prospective study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2016;20(1):113-114.
43. Awad LS, Abdallah DI, Mugharbil AM, et al. An antibiotic stewardship exercise in the ICU: building a treatment algorithm for the management of ventilator-associated pneumonia based on local epidemiology and the 2016 Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society guidelines. *Infection and drug resistance*. 2018;11:17.
44. Yilmaz G, Salyan S, Aksoy F, Köksal İ. Individualized antibiotic therapy in patients with ventilator-associated pneumonia. *Journal of medical microbiology*. 2017;66(1):78-82.

45. Rello J, Bunsow E. What is the Research Agenda in Ventilator-associated Pneumonia? *International Journal of Infectious Diseases*. 2016;51:110-112.
46. Sagasti FM. Reducing the Uncertainty of the Empirical Treatment of Hospital Acquired (HAP) and Ventilator Associated Pneumonia (VAP) against MSSA/MRSA is Feasible. *EC Pharmacology and Toxicology*. 2017;3(2):28-30.
47. Chin T, Kushner B, Dersch-Mills D, Zuege DJ. Antibiotic utilization patterns in patients with ventilator-associated pneumonia: a Canadian context. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2016;2016
48. Rello J, Paiva JA, Baraibar J, et al. International conference for the development of consensus on the diagnosis and treatment of ventilator-associated pneumonia. *CHEST Journal*. 2001;120(3):955-970.
49. Papazian L, Bregeon F, Thirion X, et al. Effect of ventilator-associated pneumonia on mortality and morbidity. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;154(1):91-97.
50. Hội Hồi sức cấp cứu và chống độc Việt nam, nam HHHV. *Khuyến cáo chẩn đoán và điều trị viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy*. 2017.
51. Rasmussen TR, Korsgaard J, Møller JK, Sommer T, Kilian M. Quantitative culture of bronchoalveolar lavage fluid in community-acquired lower respiratory tract infections. *Respiratory medicine*. 2001;95(11):885-890.
52. Joshi M, Deshpande J. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*. 2010;2(1):81-97.



53. Tạ Thành Văn. *PCR và một số kỹ thuật y sinh học phân tử*. 2010.
54. Λόζαρη Σ. *Polymerase chain reaction as a succesful biotechnological application. Ways we use PCR in the fields of bioinformatics forensics and genetics*. 2011.
55. Vân PH. PCR và real-time PCR Các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp. *NXB Y học, Hồ Chí Minh Tài liệu Tiếng Anh*. 2009;6:457-465.
56. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2002;16(1):47-51.
57. Hirama T, Yamaguchi T, Miyazawa H, et al. Prediction of the pathogens that are the cause of pneumonia by the battlefield hypothesis. *PLoS One*. 2011;6(9):e24474.
58. Bosch AA, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EA, Bogaert D. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS pathogens*. 2013;9(1):e1003057.
59. Boulter N, Suarez FG, Schibeci S, et al. A simple, accurate and universal method for quantification of PCR. *BMC biotechnology*. 2016;16(1):27.
60. Khan-Malek R, Wang Y. Statistical analysis of quantitative RT-PCR results. *Drug Safety Evaluation*. Springer; 2017:281-296.
61. Nguyễn Tiến Minh, sự vc. Ứng dụng kỹ thuật realtime PCR để chẩn đoán nhanh cúm A/H5N1 và virus hợp bào hô hấp. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 2007;5(1):19-24.
62. Hoàng TH. *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*. Trường Đại học Y Hà nội; 2012.

63. Vân PNT. *Ứng dụng kỹ thuật khuếch đại gen khảo sát các tổ hợp gen thường gặp trong bệnh lý bạch cầu cấp, góp phần phân loại nhóm tiên lượng bệnh và theo dõi điều trị, tại bệnh viện Truyền máu Huyết học thành phố Hồ Chí Minh, từ ngày 01 tháng 10 năm 2009 đến 31 tháng 7 năm 2011.* Luận án tiến sỹ y học. Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh; 2013.
  64. Hiền PT. *Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ học, lâm sàng viêm phổi không điển hình do vi khuẩn ở trẻ em.* Luận văn Tiến sỹ y học. Viện vệ sinh dịch tễ trung ương; 2014.
  65. Phạm Hùng Vân, và cộng sự. Tác nhân vi sinh gây viêm phổi cộng đồng phải nhập viện
- Kết quả nghiên cứu REAL 2016-2017. *Tạp chí Hội hô hấp thành phố Hồ Chí Minh.* 2017;
66. Clavel M, Barraud O, Moucadel V, et al. Molecular quantification of bacteria from respiratory samples in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Clinical Microbiology and Infection.* 2016;22(9):812. e1-812. e7.
  67. Peiffer-Smadja N, Bouadma L, Mathy V, et al. Performance and impact of a multiplex PCR in ICU patients with ventilator-associated pneumonia or ventilated hospital-acquired pneumonia. *Critical Care.* 2020;24(1):1-10.
  68. Mansour MGE, Albendary S. Multiplex polymerase chain reaction: Could change diagnosis of Ventilator-associated pneumonia in pediatric critical care units to the fast track? *Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* 2018;19(2):135-139.
  69. Jean S-S, Chang Y-C, Lin W-C, Lee W-S, Hsueh P-R, Hsu C-W. Epidemiology, treatment, and prevention of nosocomial bacterial pneumonia. *Journal of Clinical Medicine.* 2020;9(1):275.

70. Lee C-H, Su T-Y, Ye J-J, et al. Risk factors and clinical significance of bacteremia caused by *Pseudomonas aeruginosa* resistant only to carbapenems. *Journal of microbiology, immunology and infection*. 2017;50(5):677-683.
71. Lin K-Y, Lauderdale T-L, Wang J-T, Chang S-C. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan: Prevalence, risk factors, and impact on outcome of infections. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2016;49(1):52-59.
72. Fernández-Barat L, Ferrer M, De Rosa F, et al. Intensive care unit-acquired pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* with and without multidrug resistance. *Journal of Infection*. 2017;74(2):142-152.
73. jun Li Y, zhi Pan C, quan Fang C, et al. Pneumonia caused by extensive drug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitalized patients: genetic relationships, risk factors and mortality. *BMC infectious diseases*. 2017;17(1):371.
74. Kurup A, Liau K-H, Ren J, et al. Antibiotic management of complicated intra-abdominal infections in adults: The Asian perspective. *Annals of Medicine and Surgery*. 2014;3(3):85-91.
75. Razazi K, Dessap AM, Carteaux G, et al. Frequency, associated factors and outcome of multi-drug-resistant intensive care unit-acquired pneumonia among patients colonized with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Annals of intensive care*. 2017;7(1):1-7.
76. Jean S-S, Lee W-S, Lam C, Hsu C-W, Chen R-J, Hsueh P-R. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: current epidemics, antimicrobial susceptibility and treatment options. *Future microbiology*. 2015;10(3):407-425.

77. Vardakas KZ, Athanassaki F, Pitiriga V, Falagas ME. Clinical relevance of in vitro synergistic activity of antibiotics for multidrug-resistant Gram-negative infections: A systematic review. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2019;17:250-259.
78. Jean S-S, Hsieh T-C, Hsu C-W, Lee W-S, Bai K-J, Lam C. Comparison of the clinical efficacy between tigecycline plus extended-infusion imipenem and sulbactam plus imipenem against ventilator-associated pneumonia with pneumonic extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia, and correlation of clinical efficacy with in vitro synergy tests. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2016;49(6):924-933.
79. Timsit J-F, Esaied W, Neuville M, Bouadma L, Mourvillier B. Update on ventilator-associated pneumonia. *F1000Research*. 2017;6
80. Sarda C, Fazal F, Rello J. Management of ventilator-associated pneumonia (VAP) caused by resistant gram-negative bacteria: which is the best strategy to treat? *Expert review of respiratory medicine*. 2019;13(8):787-798.
81. Millot G, Voisin B, Loiez C, Wallet F, Nseir S. The next generation of rapid point-of-care testing identification tools for ventilator-associated pneumonia. *Annals of translational medicine*. 2017;5(22)
82. Ramírez-Estrada S, Lagunes L, Peña-López Y, et al. Assessing predictive accuracy for outcomes of ventilator-associated events in an international cohort: the EUVAE study. *Intensive care medicine*. 2018;44(8):1212-1220.
83. Abdelsalam MFA, Abdalla MS, El-Abhar HSE-D. Prospective, comparative clinical study between high-dose colistin monotherapy and colistin–meropenem combination therapy for treatment of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2018;15:127-135.

84. Geng T-T, Xu X, Huang M. High-dose tigecycline for the treatment of nosocomial carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: a retrospective cohort study. *Medicine*. 2018;97(8)
85. Abdellatif S, Trifi A, Daly F, Mahjoub K, Nasri R, Lakhil SB. Efficacy and toxicity of aerosolised colistin in ventilator-associated pneumonia: a prospective, randomised trial. *Annals of intensive care*. 2016;6(1):1-11.
86. Zampieri FG, Nassar Jr AP, Gusmao-Flores D, Taniguchi LU, Torres A, Ranzani OT. Nebulized antibiotics for ventilator-associated pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care*. 2015;19(1):1-12.
87. Rello J, Rouby J, Sole-Lleonart C, et al. Key considerations on nebulization of antimicrobial agents to mechanically ventilated patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017;23(9):640-646.
88. Tamma PD, Han JH, Rock C, et al. Carbapenem therapy is associated with improved survival compared with piperacillin-tazobactam for patients with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;60(9):1319-1325.
89. Harris PN, Tambyah PA, Lye DC, et al. Effect of piperacillin-tazobactam vs meropenem on 30-day mortality for patients with *E coli* or *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection and ceftriaxone resistance: a randomized clinical trial. *Jama*. 2018;320(10):984-994.
90. Shields RK, Potoski BA, Haidar G, et al. Clinical outcomes, drug toxicity, and emergence of ceftazidime-avibactam resistance among patients treated for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;63(12):1615-1618.
91. Rojas LJ, Salim M, Cober E, et al. Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: laboratory detection and impact on mortality. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;64(6):711-718.

92. Zhanel GG, Chung P, Adam H, et al. Ceftolozane/tazobactam: a novel cephalosporin/ $\beta$ -lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Drugs*. 2014;74(1):31-51.
93. Poulakou G, Lagou S, Karageorgopoulos DE, Dimopoulos G. New treatments of multidrug-resistant Gram-negative ventilator-associated pneumonia. *Annals of translational medicine*. 2018;6(21)
94. Barriere SL. The ATTAIN trials: efficacy and safety of telavancin compared with vancomycin for the treatment of hospital-acquired and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Future microbiology*. 2014;9(3):281-289.
95. Sandrock CE, Shorr AF. The role of telavancin in hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;61(suppl\_2):S79-S86.
96. Corey GR, Kollef MH, Shorr AF, et al. Telavancin for hospital-acquired pneumonia: clinical response and 28-day survival. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(4):2030-2037.
97. Dahal M, Schwan WR. Management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* mediated ventilator-associated pneumonia. *Current trends in microbiology*. 2018;12:95.
98. Awad SS, Rodriguez AH, Chuang Y-C, et al. A phase 3 randomized double-blind comparison of ceftobiprole medocaril versus ceftazidime plus linezolid for the treatment of hospital-acquired pneumonia. *Clinical infectious diseases*. 2014;59(1):51-61.
99. François B, Luyt C-E, Dugard A, et al. Safety and pharmacokinetics of an anti-PcrV PEGylated monoclonal antibody fragment in mechanically ventilated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Critical care medicine*. 2012;40(8):2320-2326.

100. François B. New targets for new therapeutic approaches. *Critical Care*. 2014;18(6):1-2.
101. Alp E, Eren E, Elay G, Cevahir F, Esmoğlu A, Rello J. Efficacy of loading dose of colistin in *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *Infez Med*. 2017;25(4):311-319.
102. Vazquez Guillamet C, Kollef MH. *Acinetobacter* pneumonia: improving outcomes with early identification and appropriate therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 2018;67(9):1455-1462.
103. Makris D, Petinaki E, Tsolaki V, et al. Colistin versus colistin combined with ampicillin-sulbactam for multiresistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia treatment: an open-label prospective study. *Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*. 2018;22(2):67.
104. Kengkla K, Kongpakwattana K, Saokaew S, Apisarnthanarak A, Chaiyakunapruk N. Comparative efficacy and safety of treatment options for MDR and XDR *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and network meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(1):22-32.
105. Durante-Mangoni E, Signoriello G, Andini R, et al. Colistin and rifampicin compared with colistin alone for the treatment of serious infections due to extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a multicenter, randomized clinical trial. *Clinical infectious diseases*. 2013;57(3):349-358.
106. Aydemir H, Akduman D, Piskin N, et al. Colistin vs. the combination of colistin and rifampicin for the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *Epidemiology & Infection*. 2013;141(6):1214-1222.

107. Lenhard JR, Smith NM, Bulman ZP, et al. High-dose ampicillin-sulbactam combinations combat polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii* in a hollow-fiber infection model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(3)
108. Mensa J, Barberán J, Soriano A, et al. Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. *Revista Española de Quimioterapia*. 2018;31(1):78.
109. Slekovec C, Robert J, Trystram D, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in French hospitals between 2001 and 2011: back to susceptibility. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2014;33(10):1713-1717.
110. Luyt C-E, Aubry A, Lu Q, et al. Imipenem, meropenem, or doripenem to treat patients with *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(3):1372-1380.
111. Vardakas KZ, Voulgaris GL, Maliaros A, Samonis G, Falagas ME. Prolonged versus short-term intravenous infusion of antipseudomonal  $\beta$ -lactams for patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis of randomised trials. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018;18(1):108-120.
112. Khawcharoenporn T, Chuncharunee A, Maluangnon C, Taweesakulvashra T, Tiamsak P. Active monotherapy and combination therapy for extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *International journal of antimicrobial agents*. 2018;52(6):828-834.
113. Bruyère R, Vigneron C, Bador J, et al. Significance of prior digestive colonization with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in patients with ventilator-associated pneumonia. *Critical care medicine*. 2016;44(4):699-706.



114. Shen F, Han Q, Xie D, Fang M, Zeng H, Deng Y. Efficacy and safety of tigecycline for the treatment of severe infectious diseases: an updated meta-analysis of RCTs. *International Journal of Infectious Diseases*. 2015;39:25-33.
115. Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology reviews*. 2018;31(2)
116. Tumbarello M, Trecarichi EM, De Rosa FG, et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(7):2133-2143.
117. Cancelli F, Oliva A, De Angelis M, Mascellino M, Mastroianni C, Vullo V. Role of double-carbapenem regimen in the treatment of infections due to carbapenemase producing carbapenem-resistant enterobacteriaceae: a single-center, observational study. *BioMed Research International*. 2018;2018
118. Papazian L, Klompas M, Luyt C-E. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. *Intensive care medicine*. 2020;46(5):888-906.
119. Leone M, Bouadma L, Bouhemad B, et al. Brief summary of French guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of hospital-acquired pneumonia in ICU. *Annals of intensive care*. 2018;8(1):1-7.
120. Paul M, Daikos GL, Durante-Mangoni E, et al. Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018;18(4):391-400.

121. Zaragoza R, Vidal-Cortés P, Aguilar G, et al. Update of the treatment of nosocomial pneumonia in the ICU. *Critical Care*. 2020;24(1):1-13.
122. Cisneros Herreros JM, Rosso Fernández CM, Roca Oporto C, et al. Colistin versus meropenem in the empirical treatment of ventilator-associated pneumonia (Magic Bullet study): an investigator-driven, open-label, randomized, noninferiority controlled trial. 2019;
123. Borgatta B, Gattarello S, Mazo C, et al. The clinical significance of pneumonia in patients with respiratory specimens harbouring multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a 5-year retrospective study following 5667 patients in four general ICUs. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2017;36(11):2155-2163.
124. nam HHscvcđV. Khuyến cáo chẩn đoán và điều trị viêm phổi bệnh viện viêm phổi thở máy. 2017;
125. Smith DR, Dolk FCK, Pouwels KB, Christie M, Robotham JV, Smieszek T. Defining the appropriateness and inappropriateness of antibiotic prescribing in primary care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(suppl\_2):ii11-ii18.
126. Thông TH. Nghiên cứu căn nguyên gây viêm phổi liên quan thở máy và hiệu quả dự phòng biến chứng này bằng phương pháp hút dịch liên tục hạ thanh môn. Luận án Tiến sĩ Y học, Trường Đại học Y Hà Nội; 2013.
127. Sadigov A, Mamedova I, Mammadov K. Ventilator-Associated Pneumonia and In-Hospital Mortality: Which Risk Factors may predict In-Hospital Mortality in Such Patients? *Journal of Lung Health and Diseases*. 2019;3(4)
128. Cillóniz C, Dominedò C, Torres A. An overview of guidelines for the management of hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Current opinion in infectious diseases*. 2019;32(6):656-662.

129. Ayzac L, Girard R, Baboi L, et al. Ventilator-associated pneumonia in ARDS patients: the impact of prone positioning. A secondary analysis of the PROSEVA trial. *Intensive Care Med.* May 2016;42(5):871-878. doi:10.1007/s00134-015-4167-5
130. CDC. <10-VAE\_FINAL.pdf>. 2020;
131. Torres A, García-Vidal C. Empirical treatment of adults with hospital-acquired pneumonia: lights and shadows of the 2016 Clinical Practice ATS/IDSA Guidelines. *Rev Esp Quimioter.* 2017;30(1):30-33.
132. O'Neil J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations 2016;
133. Tuon FF, Graf ME, Merlini A, et al. Risk factors for mortality in patients with ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2017;21:1-6.
134. Hou D, Ju M, Wang Y, et al. PCR coupled to electrospray ionization mass spectrometry for microbiological diagnosis and surveillance of ventilator-associated pneumonia. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2020;20(4):3587-3594.
135. Bogaerts P, Hamels S, De Mendonça R, et al. Analytical validation of a novel high multiplexing real-time PCR array for the identification of key pathogens causative of bacterial ventilator-associated pneumonia and their associated resistance genes. *Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2013;68(2):340-347.
136. Collins ME, Popowitch EB, Miller MB. Evaluation of a novel multiplex PCR panel compared to quantitative bacterial culture for diagnosis of lower respiratory tract infections. *Journal of clinical microbiology.* 2020;58(5):e02013-19.

137. Karolyi M, Pawelka E, Hind J, et al. Detection of bacteria via multiplex PCR in respiratory samples of critically ill COVID-19 patients with suspected HAP/VAP in the ICU. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2022;134(9):385-390.
138. Bogdan I, Citu C, Bratosin F, et al. The Impact of Multiplex PCR in Diagnosing and Managing Bacterial Infections in COVID-19 Patients Self-Medicating with Antibiotics. *Antibiotics*. 2022;11(4):437.
139. Baccolini V, Migliara G, Isonne C, et al. The impact of the COVID-19 pandemic on healthcare-associated infections in intensive care unit patients: a retrospective cohort study. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2021;10(1):1-9.
140. Rothe K, Feihl S, Schneider J, et al. Rates of bacterial co-infections and antimicrobial use in COVID-19 patients: a retrospective cohort study in light of antibiotic stewardship. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2021;40(4):859-869.
141. Strålin K, Ehn F, Giske CG, et al. The IRIDICA PCR/Electrospray Ionization–Mass Spectrometry Assay on Bronchoalveolar Lavage for Bacterial Etiology in Mechanically Ventilated Patients with Suspected Pneumonia. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159694.
142. Huttner A, Emonet S, Harbarth S, Renzi G, Kaiser L, Schrenzel J. Polymerase-chain reaction/electrospray ionization-mass spectrometry for the detection of bacteria and fungi in bronchoalveolar lavage fluids: a prospective observational study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(12):O1059-O1066.
143. Monard C, Pehlivan J, Auger G, et al. Multicenter evaluation of a syndromic rapid multiplex PCR test for early adaptation of antimicrobial therapy in adult patients with pneumonia. *Critical Care*. 2020;24(1):1-11.

144. Song JH, Myung SC, Choi SH, et al. Multiplex PCR of endotracheal aspirate for the detection of pathogens in ventilator associated pneumonia. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. 2008;64(3):194-199.
145. Luyt C-E, Hékimian G, Bonnet I, et al. Usefulness of point-of-care multiplex PCR to rapidly identify pathogens responsible for ventilator-associated pneumonia and their resistance to antibiotics: an observational study. *Critical Care*. 2020;24(1):1-8.
146. Vardakas K, Anifantaki F, Trigkidis K, Falagas M. Rapid molecular diagnostic tests in patients with bacteremia: evaluation of their impact on decision making and clinical outcomes. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015;34(11):2149-2160.
147. Pouly O, Lecailtel S, Six S, et al. Accuracy of ventilator-associated events for the diagnosis of ventilator-associated lower respiratory tract infections. *Annals of intensive care*. 2020;10(1):1-8.
148. Bonine NG, Berger A, Altincatal A, et al. Impact of delayed appropriate antibiotic therapy on patient outcomes by antibiotic resistance status from serious gram-negative bacterial infections. *The American journal of the medical sciences*. 2019;357(2):103-110.
149. Andrikopoulou E, Morgan CJ. Calculating measures of treatment effect for use in clinical practice. Springer; 2017.
150. Tuấn NV. ĐO LƯỜNG HIỆU QUẢ ĐIỀU TRỊ: Nguyên cơ tuyệt đối và số bệnh nhân cần điều trị.

## PHỤ LỤC

**Bảng 1.** Khuyến cáo điều trị VPLQTM do các trực khuẩn Gram âm

<b>Nghi ngờ VPLQTM do <i>A.baumannii</i></b>		<b>Yếu tố nguy cơ</b>
Tỷ lệ đề kháng ở đơn vị hồi sức tích cực cao và/hoặc BN đã từng được biết có VK cư trú kháng KS		Tuổi cao, suy giảm miễn dịch; chấn thương sọ não; ARDS; hút rửa phổi thể tích lớn; có mở khí quản; thời gian nằm viện- nằm khoa hồi sức cấp cứu kéo dài; sử dụng kháng sinh trước đó; có tiền sử nhiễm <i>A.baumannii</i> ; có tỷ lệ <i>A.baumannii</i> đa kháng cao tại đơn vị điều trị.
<b>Không: đơn trị liệu</b> Các carbapenem Các cephalosporin Ampicillin/sulbactam	<b>Có: phối hợp các KS</b> Carbapenem Và colistin Và ampicillin/sulbactam	
<b>VPLQTM do <i>A.baumannii</i></b>		
Xu hướng nhạy carbapenem và LS cải thiện <b>Đơn trị liệu:</b> Carbapenem Hoặc ampicillin/sulbactam Hoặc các KS nhạy cảm khác	Xu hướng kháng carbapenem; kháng rộng rãi/toàn kháng và lâm sàng không cải thiện <b>Phối hợp điều trị:</b> Kết hợp 2 trong các KS: colistin, aminoglycosid, ampicillin/sulbactam, liều cao carbapenem, minocycline, tigercycline	
<b>Nghi ngờ VPLQTM do <i>P.aeruginosa</i></b>		<b>Yếu tố nguy cơ</b>
Tỷ lệ đề kháng KS ở đơn vị hồi sức cấp cứu cao và/hoặc bệnh nhân đã được biết có vi khuẩn cư trú có xu hướng kháng KS		Tuổi cao, có suy giảm miễn dịch; bệnh xơ nang phổi; sốc nhiễm khuẩn; mở khí quản; có phẫu thuật; nằm viện/nằm hồi sức tích cực dài ngày; dùng KS trước đó; BN có <i>P.aeruginosa</i> cư trú; tỷ lệ <i>P.aeruginosa</i> đa kháng tại nơi điều trị cao
<b>Phối hợp các KS:</b> Beta- lactam kháng pseudomonas Và aminoglycosid (hoặc fluoroquinolon) Hoặc colistin truyền tĩnh mạch		
<b>VPLQTM do <i>P.aeruginosa</i></b>		
Không kháng KS và LS cải thiện <b>Đơn trị liệu:</b> kháng pseudomonas Các cefalosporin Beta-lactam/beta-lactamase (Fluoroquinolon)	Xu hướng kháng carbapenem rộng rãi/toàn kháng <b>Phối hợp KS:</b> Carbapenem và colistin Ceftazidim/avibactam + Artreonam	

<b>Nghi ngờ VPLQTM do <i>K.pneumonia</i> sinh KPC</b>	<b>Yếu tố nguy cơ</b>
Có tỷ lệ lưu hành gen KPC nơi điều trị	Tuổi cao, có suy giảm miễn dịch; tiền sử nằm viện và/hoặc chuyển đến từ những đơn vị chăm sóc sức khỏe; sốc nhiễm khuẩn; sử dụng carbapenem trước đó; bệnh nhân có <i>K.pneumonia</i> - KPC cư trú; tỷ lệ <i>K.pneumonia</i> -KPC nơi điều trị cao
<b>Phối hợp các KS:</b> Carbapenem liều cao Và colistin truyền tĩnh mạch Hoặc aminoglycosid Và/hoặc tigercycline	
<b>VPLQTM do <i>K.pneumonia</i> sinh KPC</b>	
Liều cao carbapenem và colistin truyền tĩnh mạch và/hoặc tigecycline Colistin hoặc aminoglycosid và/hoặc tigecycline và/hoặc rifampicin Carbapenem kép (meropenem + ertapenem) và bất kỳ thuốc KS nhạy cảm khác	
<b>Nghi ngờ VPLQTM do <i>E.coli</i> sinh ESBL</b>	<b>Yếu tố nguy cơ</b>
Dịch tể có tỷ lệ E.coli sinh ESBL nơi điều trị cao	Tuổi cao, có suy giảm miễn dịch; sốc nhiễm khuẩn; BN có tỷ lệ <i>E.coli sinh ESBL</i> cư trú nơi điều trị cao
Carbapenem Hoặc Beta-lactam phổ hẹp Và aminoglycosid hoặc ciprofloxacin Hoặc piperacillin/tazobactam	
<b>VPLQTM do <i>E.coli</i> sinh ESBL</b>	
Carbapenem Hoặc beta-lactam/beta-lactamse (piperacillin/tazobactam) Và aminoglycosid hoặc ciprofloxacin	

**Bảng 2.** Gợi ý kháng sinh điều trị theo kinh nghiệm điều trị VPLQTM

<b>Lâm sàng</b>	<b>Nhóm kháng sinh chọn</b>	<b>Kháng sinh cụ thể</b>
VPLQTM sớm (< 5 ngày), không có nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng (MDR)*	Kháng sinh nhóm $\beta$ -lactam không diệt <i>Pseudomonas</i>	Amoxicillin/clavulanic[20] acid hoặc cephalosporin thế hệ thứ 3
VPLQTM muộn ( $\geq$ 5 ngày), <b>hoặc</b> có nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng (MDR)	Kháng sinh nhóm $\beta$ -lactam diệt <i>P.aeruginosa</i> và nhóm kháng sinh khác diệt <i>Pseudomonas</i>	Cefepime 2g/8giờ <b>hoặc</b> Ceftazidime 2g/8giờ <b>hoặc</b> Piperacillin–tazobactam 4g/ 6 giờ <b>hoặc</b> Meropenem 2g/8 giờ Amikacin 2,5mg/kg/ngày <b>hoặc</b> Ciprofloxacin 1200mg/ngày
Có <i>Staphylococcus aureus</i> cư trú <b>hoặc</b> ở đơn vị điều trị có tỷ lệ nhiễm <i>Staphylococcus aureus</i> kháng methicillin cao (> 25%)	Kháng sinh diệt tụ cầu vàng kháng methicillin (MRSA)	Vancomycin 30–45 mg/kg/ngày <b>hoặc</b> Linezolid 600 mg/12giờ
Có <i>Enterobacteriaceae</i> kháng carbapenem cư trú hoặc <i>P.aeruginosa</i> chỉ nhạy cảm với kháng sinh nhóm $\beta$ -lactam mới.	Kháng sinh nhóm $\beta$ -lactam mới.	Ceftolozane–tazobactam 3g/ 8 giờ <b>hoặc</b> Ceftazidime–avibactam 2,5g/ 8 giờ <b>hoặc</b> Meropenem–vaborbactam 4g/8 giờ <b>hoặc</b> Imipenem–relebactam 1,5g/ 6 giờ.

(\*) Tình huống lâm sàng không có trong khuyến cáo hướng dẫn của Hiệp hội nhiễm khuẩn và Hiệp hội lồng ngực Hoa kỳ (IDSA/ATS)

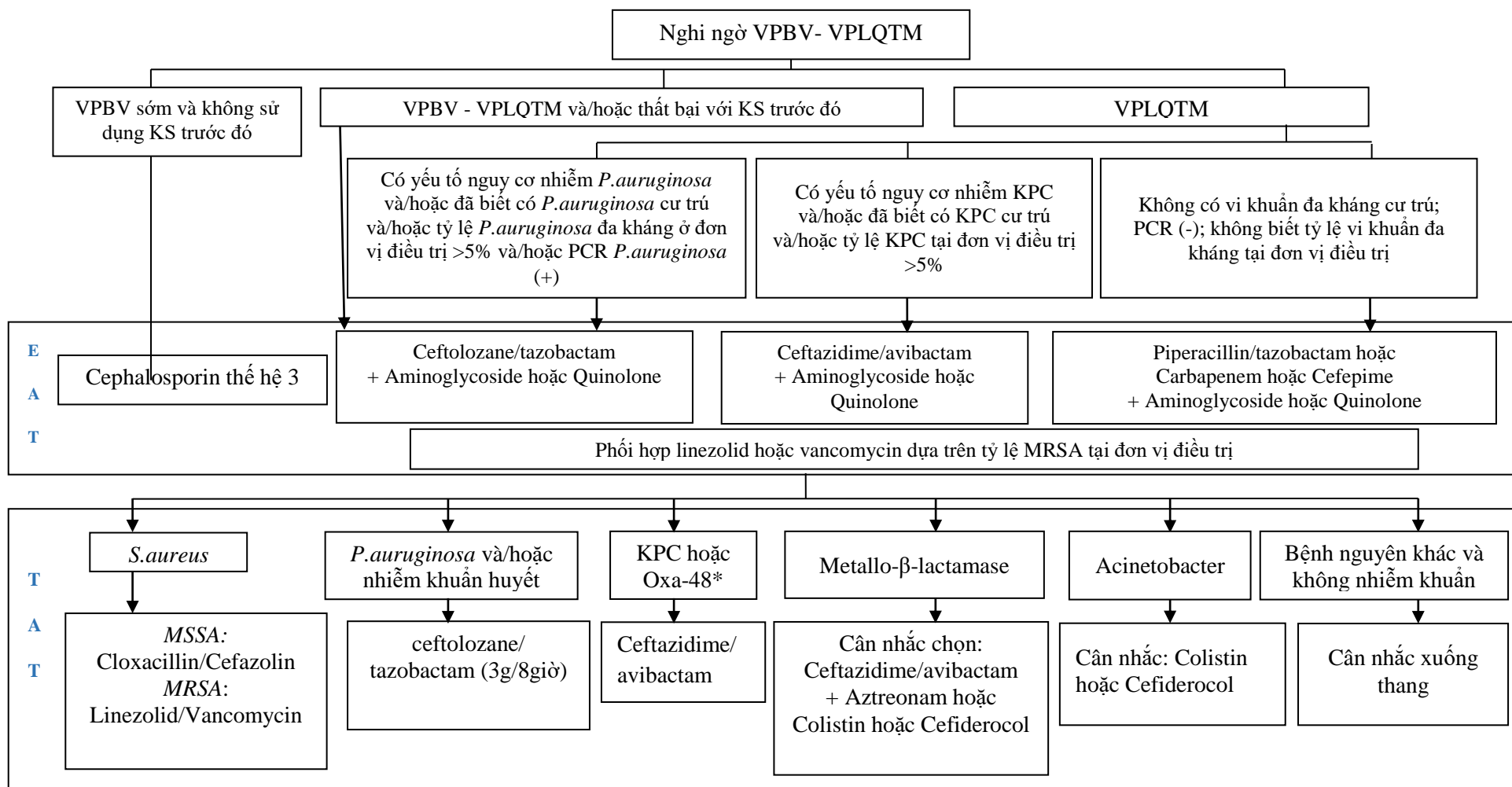


**Bảng 3.** Các phác đồ và liều lượng kháng sinh được khuyến cáo (với độ thanh thải creatinin > 50ml/phút) điều trị VPBV, VPLQTM liên quan đến trực khuẩn *A.baumannii* và *Enterobacteriaceae* kháng thuốc[73]

Vi khuẩn	Các kháng sinh được khuyến cáo
<p><i>Acinetobacter baumannii</i> kháng carbapenem hoặc kháng thuốc rộng rãi</p>	Ampicillin/sulbactam (1,5g/lọ): 3g/6giờ truyền nhỏ giọt tĩnh mạch (Nếu huyết động ổn định)
	Khí dung colististimate sodium(2 MUI/lọ): 2 lọ/ 8giờ (Nếu huyết động ổn định).
	Liều cao meropenem (truyền tĩnh mạch kéo dài 3giờ), hoặc doripenem (truyền tĩnh mạch kéo dài 3giờ), hoặc imipenem/cilastatin, thêm sulbactam: 2.0g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/6giờ, hoặc colistin (66.8 mg/lọ): 2.5–5.0mg/kg/ngày truyền nhỏ giọt tĩnh mạch (2–3 lần/ ngày).
	± Khí dung colistimethate sodium (2 MUI/ lọ): 1–2 lọ/12giờ hoặc mỗi 8giờ, hoặc ± Amikacin: 15–20 mg/kg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch một lần/ngày, nếu có nhiễm khuẩn huyết nặng và/ hoặc nhiễm khuẩn tiết niệu, và kháng sinh đồ nhạy cảm với amikacin
	Tigecycline: 50 mg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/12giờ (sau 150–200 mg liều nạp + carbapenem (truyền tĩnh mạch kéo dài 3giờ nếu cần thiết)
<p><i>Enterobacteriaceae spp</i> kháng carbapenem</p>	Tigecycline: 50 mg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/12 giờ (sau khi nạp 150–200 mg) + Meropenem: 2g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch kéo dài/ 8giờ, và colistin (66,8 mg/ lọ): 1lọ truyền nhỏ giọt tĩnh mạch /8giờ, hoặc 2 lọ truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/12giờ; hoặc Fosfomycin: 2g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/ 6giờ.
	Ceftazidime-avibactam: 2,5g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/ 8giờ.
	Sử dụng carbapenem kép (ertapenem: 1g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/ ngày + meropenem liều cao hoặc doripenem (truyền tĩnh mạch kéo dài 3giờ)) ( <i>Enterobacteriaceae</i> sinh gen kháng carbapenem KPC; kháng colistin)[121].

**Bảng 4.** Các phác đồ và liều lượng kháng sinh được khuyến cáo (với độ thanh thải creatinin > 50ml/ phút) điều trị VPBV- VPLQTM do *P.aeruginosa* và/ hoặc do *S.aureus* kháng methicillin

<b>Mức độ nặng và yếu tố nguy cơ</b>	<b>Kháng sinh khuyến cáo</b>
Huyết động ổn định, nguy cơ đa kháng thuốc thấp	Sử dụng bất kỳ KS chống Pseudomonas nào (trừ đơn trị liệu aminoglycosid )
Huyết động không ổn định, hoặc nguy cơ cao nhiễm trực khuẩn Gram âm đa kháng thuốc	<b>Đơn trị liệu với bất kỳ kháng sinh nào dưới đây:</b>
	Ceftolozane-tazobactam: 1,5g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch mỗi 8giờ [35]
	Ceftazidime-avibactam: 2,5g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch mỗi 8giờ hoặc
	Piperacillin-tazobactam: 4,5g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch kéo dài 3 giờ mỗi 6giờ
	Ceftazidime: 2g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch kéo dài 3 giờ mỗi 8giờ
	Cefepime: 2g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch kéo dài 3 giờ mỗi 12giờ hoặc mỗi 8giờ
	Imipenem/cilastatin sodium: 500 mg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch mỗi 6giờ hoặc 1g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch mỗi 8giờ
	Meropenem: 1–2g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch kéo dài 3 giờ mỗi 8giờ
	Cefoperazone-sulbactam: 4g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/ 12giờ
	+ Bất kỳ kháng sinh nào dưới đây: Ciprofloxacin: 400mg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch mỗi 8giờ (ưu tiên), hoặc thay thế bằng levofloxacin: 750mg/ngày
Colistin (66,8mg/lọ): 5mg/kg liều nạp truyền nhỏ giọt tĩnh mạch, sau đó 2,5mg x (1,5 x CrCl + 30) truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/ 12giờ. ± colistimethate sodium khí dung (2MUI/lọ): 1–2lọ/ 12giờ hoặc 8giờ, hoặc ± Amikacin: 15–20 mg/kg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/ ngày, nếu có nhiễm khuẩn huyết kết hợp nhiễm khuẩn tiết niệu và kháng sinh đồ nhạy cảm với amikacin	
Nguy cơ nhiễm <i>Staphylococcus aureus</i> kháng methicillin (MRSA)	Vancomycin: liều nạp 25–30 mg/kg, sau đó duy trì 15mg/kg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch mỗi 12giờ, hoặc
	Teicoplanin: liều nạp: 12mg/kg mỗi 12giờ x 3 lần, sau đó duy trì 6–12mg/kg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch một lần/ngày, hoặc
	Linezolid: 600 mg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch mỗi 12 giờ



**Sơ đồ 1. Cập nhật điều trị kháng sinh VPBV- VPLQTM theo kinh nghiệm**

\* EAT (Empirical Antibiotic Treatment) Điều trị kháng sinh theo kinh nghiệm; TAT (Target Antibiotic Treatment): Điều trị kháng sinh theo đích

**Bảng 5.** Các kháng sinh ban đầu điều trị VPBV theo kinh nghiệm

Viêm phổi bệnh viện không phải mức độ nặng và không có nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng	Viêm phổi bệnh viện nặng hoặc có nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng	Viêm phổi bệnh viện không phải mức độ nặng nhưng có nguy cơ nhiễm <i>Staphylococcus aureus</i> kháng methicillin
<i>Một trong những lựa chọn sau</i>	<i>Hai trong các lựa chọn sau, tránh dùng 2 beta lactam</i>	<i>Một trong những lựa chọn sau</i>
+ Piperacillin-tazobactam 4,5g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 6 giờ	+ Piperacillin-tazobactam 4,5g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 6 giờ.	+ Piperacillin-tazobactam 4,5g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 6 giờ.
HOẶC	HOẶC	HOẶC
Cefepime 2g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 8 giờ	Cefepime hoặc Ceftazidime 2g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 8 giờ.	Cefepime 2g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 8 giờ.
HOẶC		
+ Levofloxacin . 750mg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ . Hoặc 500 mg truyền tĩnh mạch mỗi 12 giờ trong nhiễm khuẩn nặng	+ Levofloxacin . 750mg truyền tĩnh mạch mỗi 24giờ . Hoặc 500 mg truyền tĩnh mạch mỗi 12 giờ trong nhiễm khuẩn nặng + Ciprofloxacin 400mg truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ	+ Levofloxacin . 750mg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ Hoặc 500 mg truyền tĩnh mạch mỗi 12 giờ trong nhiễm khuẩn nặng + Ciprofloxacin 400mg truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ
HOẶC	HOẶC	HOẶC
Imipenem 500mg truyền tĩnh mạch trong 3 giờ mỗi 6 giờ	Imipenem 500mg truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 6 giờ Meropenem 1g truyền tĩnh mạch trong 4 giờ, mỗi 8 giờ Doripenem 0,5 – 1 g truyền tĩnh mạch trong 4 giờ, mỗi 8 giờ	Imipenem 500mg truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 6 giờ Meropenem 1g truyền tĩnh mạch trong 4 giờ, mỗi 8 giờ Doripenem 0,5 – 1g truyền tĩnh mạch trong 4 giờ, mỗi 8 giờ

	<b>HOẶC</b>	<b>HOẶC</b>
	+ Amikacin 15 - 20mg/kg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ + Gentamycin 5 -7mg/kg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ + Tobramycin 5- 7mg/kg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ	Aztreonam 2g truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ
	<b>HOẶC</b>	
	Aztreonam 2g truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ	
	<b>Xem xét kết hợp</b>	<b>Kết hợp</b>
	Vancomycin 15 -20 mg/kg truyền tĩnh mạch trong 1-2 giờ, mỗi 8- 12 giờ. (Có thể dùng liều nạp 25-30 mg/kg 1 lần với những trường hợp nặng) <b>HOẶC</b> Teicoplanin Liều nạp: 6 mg/kg/12 giờ truyền tĩnh mạch trong 30 phút – 1 giờ. Truyền 3 liều Liều duy trì: 6 mg/kg/24 giờ (400mg) truyền tĩnh mạch trong 30 phút – 1 giờ.	Vancomycin 15 -20 mg/kg truyền tĩnh mạch trong 1-2 giờ, mỗi 8- 12 giờ. (Có thể dùng liều nạp 25- 30 mg/kg 1 lần với những trường hợp nặng) <b>HOẶC</b> Teicoplanin Liều nạp: 6 mg/kg/12 giờ truyền tĩnh mạch trong 30 phút – 1 giờ. Truyền 3 liều Liều duy trì: 6 mg/kg/24 giờ (400mg) truyền tĩnh mạch trong 30 phút – 1 giờ.
	<b>HOẶC</b>	<b>HOẶC</b>
	Linezolid 600mg truyền tĩnh mạch mỗi 12 giờ	Linezolid 600mg truyền tĩnh mạch mỗi 12 giờ

**Bảng 6.** Các kháng sinh ban đầu điều trị VPLQTM theo kinh nghiệm

A. Kháng sinh tác dụng trên vi khuẩn Gram dương <i>S.aureus</i> kháng methicillin	B. Kháng sinh tác dụng trên vi khuẩn Gram âm, <i>P.aeruginosa</i> Nhóm beta –lactam	C. Kháng sinh tác dụng trên vi khuẩn Gram âm, <i>P.aeruginosa</i> Nhóm không phải beta- lactam
<p>Nhóm Glycopeptides: - Vancomycin 15 -20 mg/kg truyền tĩnh mạch trong 1-2 giờ, mỗi 8- 12giờ. (Có thể dùng liều nạp 25-30 mg/kg/lần với trường hợp nặng) - Teicoplanin: Nạp: 6mg/kg /12 giờ truyền TM trong 30 phút – 1 giờ x 3 liều. Duy trì: 6mg/kg/24giờ (400mg) truyền TM trong 30 phút – 1 giờ</p>	<p>Các penicillin kháng <i>Pseudomonas aeruginosa</i>: Piperacillin-tazobactam 4,5g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 6 giờ</p>	<p>Các fluoroquinolone - Ciprofloxacin 400mg truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ - Levofloxacin: 750mg truyền tĩnh mạch/24 giờ hoặc 500mg truyền tĩnh mạch/ 12giờ trong nhiễm khuẩn nặng</p>
HOẶC	HOẶC	HOẶC
<p>Oxazolidiones: Linezolid 600mg truyền tĩnh mạch mỗi 12 giờ</p>	<p>Các cephalosporin Cefepime 2g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ mỗi 8 giờ Ceftazidime 2g truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ</p>	<p>Các aminoglycoside Amikacin 15- 20 mg/kg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ. Gentamycin 5 – 7 mg/kg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ Tobramycin 5 – 7 mg/kg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ</p>
	HOẶC	HOẶC
	<p>Các carbapenem Imipenem 500mg truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 6 giờ Meropenem 1g truyền tĩnh mạch trong 4 giờ, mỗi 8 giờ Doripenem 0,5 – 1g, truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ</p>	<p>Các polymixin Colistin Liều nạp 5mg/kg x 1 lần Liều duy trì: 2,5 mg/kg x (1,5 x độ thanh thải creatinin +30) truyền tĩnh mạch mỗi 12 giờ Polymixin B 2,5 – 3,0 mg/kg/ngày chia 2 lần truyền tĩnh mạch</p>
	HOẶC	
	<p>Monobactam Aztreonam 2g truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ.</p>	

# KỸ THUẬT MULTIPLEX REALTIME PCR PHÁT HIỆN 5 LOẠI VI KHUẨN THƯỜNG GẶP GÂY VIÊM PHỔI BỆNH VIỆN, VIÊM PHỔI LIÊN QUAN THỞ MÁY

## 1. Các bước tiến hành:

- ✓ **Xử lý mẫu:** Đờm, dịch phết quản.
- ✓ Mẫu đờm thu nhận trước lúc đánh răng buổi sáng.
- ✓ Thêm 7ml dung dịch KTL8 vào lọ đựng bệnh phẩm chứa khoảng 2 – 3ml mẫu đờm. Lắc cho tương đối tan rồi chuyển tất cả vào ống falcon 15 ml. Vortex mạnh. Nếu mẫu đờm nhiều thì tăng lượng dung dịch KTL8 lên tương ứng.
- ✓ Thêm 5ml KTL7 vào falcon 15ml. Trộn đều. Ly tâm 6000 vòng/phút trong 20 – 30 phút
- ✓ **Nếu mẫu đờm có lẫn nhiều máu :** đổ bỏ dịch nổi, thu khoảng 0,5 ml cặn, bổ sung 5ml dung dịch KTL6 vào mẫu, trộn đều, ủ lạnh 4°C trong 10 phút. Vortex đều trước khi ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút.
- ✓ Đổ bỏ dịch nổi, thu cặn (khoảng 0,5 ml). Thêm vào phần cặn 5 µl dung dịch KTL4. Vortex mạnh rồi ủ 60°C trong 1 – 2 giờ.
- ✓ Sau khi ủ, xử lý nhiệt các mẫu này ở 95°C trong 10 phút.
- ✓ Chuyển toàn bộ mẫu đã xử lý nhiệt vào một eppendorf 1,5ml sạch. Giữ eppendorf này trong ngăn đá tủ lạnh cho đến khi tiến hành tách chiết DNA.
- ✓ **Tách chiết DNA:** DNA được tách chiết bằng kit của Khoa thương, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- ✓ **Thực hiện phản ứng PCR:**

### **1.1. Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng realtime PCR:**

#### Chuẩn bị các thành phần của hỗn hợp phản ứng realtime PCR

- Khi chuẩn bị các thành phần của hỗn hợp phản ứng realtime PCR, sử dụng biểu pha hỗn hợp phản ứng realtime PCR gồm các thông tin sau: các

thành phần của hỗn hợp, nồng độ cuối cùng của các thành phần trong hỗn hợp, số lượng mẫu, thể tích của từng thành phần.

- Lấy các thành phần của hỗn hợp phản ứng realtime PCR từ  $-20^{\circ}\text{C}$  ra, để vào khay lạnh chuyên dùng cho realtime PCR hoặc để ở ngăn mát tủ lạnh hoặc để vào hộp đá vụn. Khi các thành phần tan hoàn toàn, trộn đều bằng cách búng nhẹ vào đáy tube và ly tâm ngắn trước khi mở nắp. Khi sử dụng nên trộn đều các thành phần 2 – 3 lần bằng pipet.

- Việc thực hiện realtime PCR đa môi cho 5 tác nhân được chia thành 2 hỗn hợp phản ứng:

- Hỗn hợp 1: *A.baumannii*, *E.coli* và *K.pneumoniae*
- Hỗn hợp 2: *P.aeruginosa* và *S.aureus*

- Chuẩn bị 2 ống eppendorf có dung tích lớn hơn tổng thể tích các thành phần của hỗn hợp phản ứng realtime PCR. Đánh dấu các ống này là PCR mix (kí hiệu tương ứng cho 2 hỗn hợp phản ứng).

- Dùng micropipet với thể tích phù hợp với thể tích của từng loại thành phần. Lấy các thành phần theo thứ tự ghi trong biểu mẫu pha thành phần realtime PCR. Trộn đều các thành phần trong các tube PCR mix, ly tâm ngắn sau đó chia 23 $\mu\text{l}$  hỗn hợp phản ứng PCR vào các ống PCR 0,1ml hoặc 0,2ml. Đậy nắp các ống đã có thành phần của phản ứng PCR.

- Ly tâm ngắn (với ống 0,2ml) hoặc vẩy (với ống 0,1ml) để thu tất cả thành phần phản ứng xuống đáy ống.

- Chứng âm được sử dụng là nước PCR tinh sạch.

- Hai hỗn hợp phản ứng realtime PCR tương ứng để phát hiện 5 loại VK, thể tích hỗn hợp cuối cùng là 25 $\mu\text{l}$ , bao gồm các thành phần:



**Bảng 1.** Thành phần hoá chất phản ứng PCR, vật tư tiêu hao và điều kiện bảo quản của các hoá chất

<i>STT</i>	<i>Tên Hóa chất/ vật liệu</i>	<i>Thành phần chính</i>	<i>Số lượng</i>	<i>Bảo quản</i>
<b>Hóa chất xử lý mẫu</b> <i>AccuRive TB ProcSample Kit, EX-PRO01.1A</i>				
1	<i>Dung dịch KTL2</i>		<i>1 x 10 ml</i>	Nhiệt độ phòng
2	<i>Dung dịch KTL3</i>		<i>1 x 500 µl</i>	Nhiệt độ phòng
3	<i>Dung dịch KTL4</i>		<i>1 x 300 µl</i>	2-8°C
4	<i>Dung dịch KTL6</i>		<i>1 x 50 ml</i>	2-8°C
5	<i>Dung dịch KTL7</i>		<i>1 x 500 ml</i>	Nhiệt độ phòng
6	<i>Dung dịch KTL8</i>		<i>1 x 370 ml</i>	Nhiệt độ phòng
<b>Hóa chất tách chiết cật DNA</b> <i>AccuRive sDNA PrepKit - EX-DNA02.1F</i>				
7	<i>Dung dịch KTC1</i>	<i>Guanidine hydrochloride</i>	<i>1 x 15ml</i>	Nhiệt độ phòng
8	<i>Dung dịch KTC2</i>	<i>Iso-propanol</i>	<i>1 x 10ml</i>	Nhiệt độ phòng
9	<i>Dung dịch KTC3</i>	<i>Guanidine hydrochloride, Ethanol</i>	<i>1 x 30ml</i>	Nhiệt độ phòng
10	<i>Dung dịch KTC4</i>	<i>Ethanol</i>	<i>1 x 30 ml</i>	Nhiệt độ phòng
11	<i>Dung dịch KTS5</i>		<i>1 x 5ml</i>	Nhiệt độ phòng
12	<i>Dung dịch KTL4</i>		<i>1 x 0,5ml</i>	<b>2-8°C</b>
13	<i>Cột silica</i>		<i>50 cột</i>	Nhiệt độ phòng
14	<i>Eppendorf 2,0 ml</i>		<i>100 cái</i>	Nhiệt độ phòng
15	<i>Eppendorf 1,5 ml</i>		<i>100 cái</i>	Nhiệt độ phòng
<b>Hóa chất PCR</b>				
16	<i>DNA IC</i>	<i>DNA chứng nội ngoại sinh</i>	<i>1 x 0.5 ml</i>	-20 °C hoặc lạnh sâu hơn
17	MasterMix Q01ABA02.1A – MM	-Tris-HCL Ph 8.0, KCl, MgCl <sub>2</sub> -dATP, dTTP, dCTP, dGTP -Taq DNA polymerase	<i>3 x 200µl</i>	-20 °C hoặc lạnh sâu hơn

18	PrimobeMix Q01ABA02.1A –PM	-Hệ môi nhân bản vùng gene đích -TaqMan đặc hiệu cho vi khuẩn đích (FAM) -Hệ môi nhân bản DNA IC -TaqMan đặc hiệu DNA IC (HEX)	3 x 210 $\mu$ l	-20 °C hoặc lạnh sâu hơn
19	Chứng dương E2 (Positive control E2) -PC2	DNA vi khuẩn đích nồng độ $10^2$ bản sao/ $\mu$ l	1 x 30 $\mu$ l	-20 °C hoặc lạnh sâu hơn
20	Chứng dương E3 (Positive control E3) -PC3	DNA vi khuẩn đích nồng độ $10^3$ bản sao/ $\mu$ l	1 x 30 $\mu$ l	-20 °C hoặc lạnh sâu hơn
21	Chứng dương E5 (Positive control E5) - PC5	DNA vi khuẩn đích nồng độ $10^5$ bản sao/ $\mu$ l	1 x 30 $\mu$ l	-20 °C hoặc lạnh sâu hơn
22	Chứng dương E7 (Positive control E7) - PC7	DNA vi khuẩn đích nồng độ $10^7$ bản sao/ $\mu$ l	1 x 30 $\mu$ l	-20 °C hoặc lạnh sâu hơn
23	Eppendorf 0,2 ml/0,1 ml (tùy loại máy realtime sử dụng)		57 ống	Nhiệt độ phòng

- Mẫu DNA được bảo quản ở -20°C và được rã đông ở nhiệt độ phòng, trộn đều bằng cách búng nhẹ, ly tâm ngắn trước khi mở nắp.
- Tra mẫu DNA vào hỗn hợp phản ứng realtime PCR, quá trình được tiến hành trong tủ an toàn sinh học cấp 2 chuyên dùng để tra mẫu bệnh phẩm (trước và sau khi tra mẫu, làm sạch tủ bằng cồn 70%, bật đèn tím 30 phút).
- Hỗn hợp thành phần phản ứng realtime PCR sau khi đã bổ sung DNA và chứng được đưa vào máy realtime PCR.

## 1.2. Thực hiện phản ứng PCR trên máy luân nhiệt:

### 1.2.1. Thực hiện phản ứng realtime PCR định tính:

- Xếp các ống phản ứng vào máy luân nhiệt
- Cài đặt chương trình định dạng vị trí các mẫu, chứng dương PCR, chứng âm PCR trong block nhiệt của máy (Plate setup), chọn màu huỳnh quang phát hiện đặc trưng cho từng tác nhân theo bảng dưới đây:

**Bảng 2.** Màu huỳnh quang phát hiện đặc trưng cho từng tác nhân

	Màu huỳnh quang phát hiện	Tác nhân phát hiện
Hỗn hợp phản ứng 1	FAM	<i>A.baumannii</i>
	HEX	IC*
	ROX	<i>E.coli</i>
	Cy5	<i>K.pneumoniae</i>
Hỗn hợp phản ứng 2	FAM	<i>P.aeruginosa</i>
	HEX	IC*
	ROX	<i>S.aureus</i>

\*DNA chứng nội ngoại sinh

- Thiết lập chu kỳ nhiệt thích hợp, cả 2 hỗn hợp phản ứng đều được thực hiện ở cùng một chu trình nhiệt, phản ứng realtime PCR sẽ được thực hiện với chu trình bảng 3.

**Bảng 3.** Chu kỳ nhiệt thực hiện trên máy PCR

Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ lặp lại	Lưu ý
95°C	15 phút	1	
95°C	20 giây	40	Thu tín hiệu huỳnh quang phát hiện
60°C	1 phút		

- Kết thúc chu kỳ nhiệt, thực hiện các bước phân tích kết quả, những tác nhân có giá trị Ct xác định được xác định là “Dương tính với DNA VK đích” sẽ được thực hiện bước phân tích realtime PCR định lượng (mục 1.2.2), những tác nhân có giá trị Ct không xác định (N/A) được xác định là “Âm tính với DNA VK đích”.

### 1.2.2. Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng

- Xếp các ống phản ứng vào máy luân nhiệt
- Cài đặt chương trình định dạng vị trí các mẫu, chứng âm PCR trong block nhiệt của máy (Plate setup), chọn màu huỳnh quang phát hiện đặc trưng cho từng tác nhân theo bảng 3.
- Khai báo định dạng mẫu cho các giếng chứng dương là Standard, khai báo nồng độ DNA chứng dương trên máy khi sử dụng cho từng tác nhân đích lần lượt theo bảng 4

**Bảng 4.** Nồng độ chứng dương cho từng vi khuẩn đích trong phản ứng realtime PCR định lượng

Tác nhân đích	Tên chứng dương	Nồng độ (bản sao)
<i>A.baumannii</i>	Chứng dương E2	$5 \times 10^2$
	Chứng dương E3	$5 \times 10^3$
	Chứng dương E5	$5 \times 10^5$
	Chứng dương E7	$5 \times 10^7$
<i>E.coli</i>	Chứng dương E2	$5 \times 10^2$
	Chứng dương E3	$5 \times 10^3$
	Chứng dương E5	$5 \times 10^5$
	Chứng dương E7	$5 \times 10^7$
<i>K.pneumoniae</i>	Chứng dương E2	$5 \times 10^2$
	Chứng dương E3	$5 \times 10^3$
	Chứng dương E5	$5 \times 10^5$
	Chứng dương E7	$5 \times 10^7$
<i>P.aeruginosa</i>	Chứng dương E2	$5 \times 10^2$
	Chứng dương E3	$5 \times 10^3$
	Chứng dương E5	$5 \times 10^5$
	Chứng dương E7	$5 \times 10^7$
<i>S.aureus</i>	Chứng dương E2	$5 \times 10^2$
	Chứng dương E3	$5 \times 10^3$
	Chứng dương E5	$5 \times 10^5$
	Chứng dương E7	$5 \times 10^7$

- Thiết lập chu kỳ nhiệt thích hợp, cả 2 hỗn hợp phản ứng đều được thực hiện ở cùng một chu trình nhiệt, phản ứng realtime PCR sẽ được thực hiện với chu trình theo bảng 2.5.

- Kết thúc chu kỳ nhiệt, thực hiện các bước phân tích kết quả, lưu lại kết quả và vệ sinh thiết bị.

## 2. Kết quả và biện luận

### 2.1. Kết quả và biện luận phản ứng multiplex realtime PCR định tính

Kiểm tra đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang của các mẫu theo trình tự sau:

- Tín hiệu huỳnh quang của mẫu chứng dương PCR đều vượt ngưỡng ở tất cả các kênh màu

- Tín hiệu huỳnh quang chứng âm tách chiết và chứng âm PCR dưới ngưỡng ở tất cả các kênh màu phát hiện

- Đối với mẫu xét nghiệm, đọc kết quả theo nguyên tắc: lên tín hiệu nào đọc đối tượng tương ứng với tín hiệu đó (theo các bảng 4. và bảng 5). Kết quả cuối cùng của mẫu là kết quả tổng hợp từ cả hỗn hợp phản ứng 1 và 2.

**Bảng 5.** Phân tích kết quả trong hỗn hợp phản ứng 1

Phản ứng 1					
Trường hợp	FAM ( <i>A.baumannii</i> )	ROX ( <i>E.coli</i> )	Cy5 ( <i>K.pneumoniae</i> )	HEX (IC)	Kết luận
Trường hợp 1	-	-	-	-	Âm tính giả, thực hiện lại phản ứng từ bước tách chiết
Trường hợp 2	-	-	-	+	Dưới ngưỡng phát hiện với cả 3 VK <i>A.baumannii</i> , <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i>
Trường hợp 3	+	-	-	+/-	Dương tính với VK <i>A.baumannii</i> , Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với <i>A.baumannii</i>
Trường hợp 4	-	+	-	+/-	Dương tính với <i>E.coli</i> , Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với <i>E.coli</i>

Trường hợp 5	-	-	+	+/-	Dương tính với <i>K.pneumoniae</i> , Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với <i>K.pneumoniae</i>
Trường hợp 6	+	+	-	+/-	Đồng dương tính <i>A.baumannii</i> , <i>E.coli</i> , Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với cả 2 VK <i>A.baumannii</i> , <i>E.coli</i>
Trường hợp 7	+	-	+	+/-	Đồng dương tính <i>A.baumannii</i> , <i>K.pneumoniae</i> . Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với cả 2 VK <i>A.baumannii</i> , <i>K.pneumoniae</i>
Trường hợp 8	-	+	+	+/-	Đồng dương tính <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> .. Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với cả 2 VK <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i>
Trường hợp 9	+	+	+	+/-	Đồng dương tính với <i>A.baumannii</i> , <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> . Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với cả 3 VK <i>A.baumannii</i> , <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i>

**Bảng 6.** Phân tích kết quả trong hỗn hợp phản ứng 2

Phản ứng 2				
Trường hợp	FAM ( <i>P.aeruginosa</i> )	ROX ( <i>S.aureus</i> )	HEX (IC)	Kết luận
Trường hợp 1	-	-	-	Âm tính giả, thực hiện lại phản ứng từ bước tách chiết
Trường hợp 2	-	-	+	Dưới ngưỡng phát hiện <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i>
Trường hợp 3	+	-	+/-	Dương tính với <i>P.aeruginosa</i> . Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với <i>P.aeruginosa</i>
Trường hợp 4	-	+	+/-	Dương tính với <i>S.aureus</i> . Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với <i>S.aureus</i>
Trường hợp 5	+	+	+/-	Đồng dương tính <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i> . Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với cả 2 VK <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i>

- + Tín hiệu huỳnh quang vượt ngưỡng
- Tín hiệu huỳnh quang không vượt ngưỡng
- Tín hiệu huỳnh quang chứng âm PCR: Không thu được tín hiệu ở tất cả các kênh màu phát hiện.
- Hàm lượng DNA của từng VK đích trong từng hỗn hợp phản ứng dương tính được tính dựa trên đường cong chuẩn xây dựng từ các nồng độ DNA chứng dương Standard đã biết và được hiển thị trên phần mềm xử lý của máy realtime sử dụng.

## 2.2. Kết quả và biện luận phản ứng realtime PCR định lượng

Kiểm tra đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang và Ct của các mẫu theo trình tự sau:

- Tín hiệu huỳnh quang của các mẫu chứng dương standard.

**Bảng 7.** Phân tích kết quả chứng dương standard theo từng tác nhân

Tác nhân đích	Tên chứng dương	Ct
<i>A.baumannii</i>	Chứng dương E2	28.38 ± 1.65
	Chứng dương E3	25.43 ± 1.65
	Chứng dương E5	18.45 ± 1.65
	Chứng dương E7	11.9 ± 1.65
<i>E.coli</i>	Chứng dương E2	27.78 ± 1.65
	Chứng dương E3	24.52 ± 1.65
	Chứng dương E5	17.64 ± 1.65
	Chứng dương E7	11.00 ± 1.65
<i>K.pneumoniae</i>	Chứng dương E2	27. 51 ± 1.65
	Chứng dương E3	24.04 ± 1.65
	Chứng dương E5	17.68 ± 1.65
	Chứng dương E7	11.16 ± 1.65
<i>P.aeruginosa</i>	Chứng dương E2	31.30 ± 1.65
	Chứng dương E3	28.40 ± 1.65
	Chứng dương E5	21.08 ± 1.65
	Chứng dương E7	14.36 ± 1.65
<i>S.aureus</i>	Chứng dương E2	32.19 ± 1.65
	Chứng dương E3	30.75 ± 1.65
	Chứng dương E5	23.03 ± 1.65
	Chứng dương E7	16.20 ± 1.65

# HỒ SƠ NGHIÊN CỨU THIẾT KẾ BỘ SINH PHẨM MULTIPLEX REALTIME PCR

(Phát hiện 5 tác nhân vi khuẩn thường gặp gây viêm phổi bệnh viện, viêm phổi liên quan thở máy)

## 1. Thiết kế hệ môi- probe

Hệ môi và probe của qui trình được tham khảo từ nghiên cứu của Gadsby và cộng sự [10].

### 1.1. Thiết kế môi cho *Pseudomonas aeruginosa*

Để phát hiện *P. aeruginosa* bằng kỹ thuật sinh học phân tử nhiều gen mục tiêu khác nhau đã được báo cáo, chẳng hạn như *16s rRNA*, *toxA*, *oprI*, *ecfX* và *gyrB*. Trong số các trình tự mục tiêu này, nghiên cứu chọn gen *gyrB* (*gyrase subunit B*), đây là vùng gen mã hóa cho DNA, là trình tự để phát hiện *P.aeruginosa* [60]. Do *P.aeruginosa* có tốc độ tiến hóa bộ gen nhanh và có sự chuyển gen ngang chậm hơn nên gen mục tiêu *gyrB* được đánh giá là một xét nghiệm đặc biệt có độ nhạy và độ nhạy cao khi thử nghiệm với các chủng *P.aeruginosa*. Bên cạnh đó, gen *gyrB* còn cho thấy tỷ lệ phát hiện và độ đặc hiệu cao hơn trên các chủng phân lập lâm sàng so với các trình tự khác.

### 1.2. Thiết kế môi cho *Klebsiella pneumoniae*

Gen mục tiêu được sử dụng để phát hiện *K. pneumoniae* là *gltA*. Gen *gltA* rất quan trọng đối với *K. pneumoniae*, sản phẩm do gen này mã hóa tham gia vào quá trình sinh tổng hợp citrate và cho phép *K. pneumoniae* có thể sao chép và nhân bản ở phổi và ruột. Bộ môi chúng tôi sử dụng từ nghiên cứu của Robert và cộng sự đã được chứng minh không có phản ứng chéo với 50 loài khác và nhân bản thành công cho tất cả 200 chủng vi khuẩn *K. pneumoniae*[61].

### 1.3. Thiết kế môi cho *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter* có các gen kháng carbapenem tự nhiên và báo cáo đầu tiên về gen này đã mô tả blaOXA-51. Một nghiên cứu trên 106 chủng *A.baumannii* cho thấy tất cả các mẫu dương tính blaOXA-51 đều được xác định đúng là *A.baumannii*, còn các



mẫu âm tính blaOXA-51 được xác định là các loài *Acinetobacter* khác, hay nói cách khác nhóm gen blaOXA-51 có gần như ở tất cả các chủng *A.baumannii* và không được tìm thấy ở các loài *Acinetobacter* khác[62],[63]. Chính vì vậy, chúng tôi chọn blaOXA-51 là môi sử dụng trong nghiên cứu.

#### **1.4. Thiết kế môi cho *Escherichia coli***

Hai đoạn môi phát hiện *E.coli* nhắm đến các gen đích *hdeA* và *yccT* được coi là có triển vọng nhất trong nghiên cứu gần đây. Tuy nhiên, 9/200 chủng phân lập lâm sàng thì không khuếch đại được bằng *hdeA* [61]. Trong đó, chỉ có *yccT* là khuếch đại thành công tất cả 200 mẫu phân lập trong nghiên cứu của Robert cũng như với hiệu suất khuếch đại là 98,1% và do đó được chọn là môi cuối cùng để phát hiện *E.coli* và kết quả này được áp dụng trong nghiên cứu[61]. Do mức độ tương đồng cao về bộ gen giữa *E.coli* và *Shigella* (80 – 90%), rất khó để tìm được vùng mục tiêu đặc hiệu riêng cho *E.coli*. Tuy nhiên, vì *Shigella* rất hiếm khi được tìm thấy trong đường hô hấp, vì vậy chủng *Shigella* không được coi là tác nhân liên quan gây bệnh trong chẩn đoán viêm phổi[60].

#### **1.5. Thiết kế môi cho *Staphylococcus aureus***

Sự đề kháng kháng methicillin ở *S.aureus* được mã hóa bởi gen *mecA*, phát hiện gen *mecA* bằng PCR được coi là tiêu chuẩn vàng để phát hiện *S.aureus* kháng methicillin[64]. Ngoài ra, gen *nuc* đã thành công trong việc dùng để phân biệt *S.aureus* với các *Staphylococcus spp* khác, gen *tuc* cho phép phát hiện *Staphylococcus* ở cấp độ chi[65],[66]. Xác định cả ba gen này đồng thời trong cùng một ống phản ứng đem lại nhiều lợi điểm, nó giúp phân biệt *S.aureus* kháng methicillin (MRSA), *S.aureus* còn nhạy cảm methicillin (MSSA), *Staphylococcus* kháng methicillin không gây đông máu (MRCoNS). Nếu sử dụng *mecA* là gen mục tiêu của realtime PCR để phát hiện MRSA thì phản ứng có độ nhạy 100% và độ đặc hiệu 100%[67]. Dựa trên những cơ sở này, chúng tôi đã lựa chọn 3 gen này làm gen đích sử dụng trong nghiên cứu.

Kiểm tra độ đặc hiệu *in silico*: - Tất cả các cặp môi đều được kiểm tra trên PCR *in silico* (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) và công cụ Primer BLAST (NCBI).

Mỗi phải bắt đặc hiệu đối với các chủng mục tiêu. Các probe được kiểm trên công cụ Nucleotide BLAST (NCBI).

**Bảng 1.** Trình tự Primer-Probe sử dụng trong nghiên cứu

Chủng mục tiêu	Tên	Trình tự (5'->3')	Chiều dài	Tm	GC%
<i>E. coli</i>	<i>yccT</i> -F	ATCGTGACCACCTTGATT	18	53.37	44.44
	<i>yccT</i> -R	TACCAGAAGATCGACATC	18	50.30	44.44
	<i>yccR</i> -P	CATTATGTTTGCCGGTATCCGTTT	24	56	41.7
<i>K. pneumoniae</i>	<i>gltA</i> -F	AGGCCGAATATGACGAAT	18	53.34	44.44
	<i>gltA</i> -R	GGTGATCTGCTCATGAA	17	50.68	47.06
	<i>gltA</i> -P	ACTACCGTCACCCGCCACA	19	61.4	63.2
<i>P. aeruginosa</i>	<i>gyrB</i> -F	CCTGACCATCCGTCGCCACAAC	22	65.88	63.64
	<i>gyrB</i> -R	CGCAGCAGGATGCCGACGCC	20	69.08	75.00
	<i>gyrB</i> -P	CCGTGGTGGTAGACCTGTTCCCAGAC C	27	65.5	63.00
<i>A. baumannii</i>	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i> F primer	GAAGTGAAGCGTGTGGTTATG	22	55.0	45.00
	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i> R primer	GCCTCTTGCTGAGGAGTAAT	20	55.0	50.00
	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i> Probe	GCCTCTTGCTGAGGAGTAAT	20	54.3	50
<i>Staphylococci</i>	tufSA-F	AAACAAC TGTACTGGTGTAGAAATG	26	53.8	34.6
	tufSA-R	AGTACGGAAATAGAATTGTG	20	47.3	35
	tufSA-P	TCCGTAAATTATTAGACTACGCTGAA GC	28	56.5	39.3
<i>S. aureus</i>	nuc-F	CATCCTAAAAAAGGTGTAGAGA	22	49.7	36.4
	nuc-R	TTCAATTTTMTTTCATTTTCTACCA	26	51.6	25
	nuc-P	TTTTCGTAAATGCACTTGCTTCAGGA CCA	29	60.7	41.4
<i>Kháng methicillin</i>	mecA-F	GGCAATATTAMCGCACCTCA	20	54.1	47.5
	mecA-R	GTCTGCCASTTTCTCCTTGT	20	54.9	50
	mecA-P	AGATCTTATGCAA ACTTAATTGGCAA ATCC	30	56.5	33.3

Ngoài ra, qui trình còn chứa một cặp mồi và mẫu dò TaqMan đặc hiệu cho một đoạn DNA nhân tạo có trình tự khác trình tự gen của các chủng mục tiêu gọi là chứng nội ngoại sinh (internal control, IC). Chứng nội sẽ được ly trích cùng với DNA trong mẫu nhằm phát hiện các chất ức chế có trong mẫu và kiểm soát hiệu quả của quá trình tách chiết DNA cũng như phản ứng PCR.

## 2. Vật liệu nghiên cứu

### 2.1. Mẫu vi khuẩn

**Bảng 2.** Danh sách các chủng vi khuẩn được sử dụng

Tên	Loại mẫu	Nguồn mẫu
<i>A. baumannii</i>	Chủng chuẩn ATCC@19606	Khoa Thương
<i>S. epidermidis</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>P. aeruginosa</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>K. pneumoniae</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>Escherichia coli</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>S.aureus</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>Listeria monocytogenes</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Listeria ivanovii</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Campylobacter coli</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Campylobacter jejuni</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Chlamydia trachomatis</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Vibrio cholerae</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Helicobacter pylori</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Shigella boydii</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Shigella sonnei</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Streptococcus agalactiae</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Salmonella typhimurium</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Salmonella paratyphi</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Clostridium botulinum</i>	DNA	Khoa Thương

## 2.2. Mẫu amplicon

Phân tử DNA mạch đôi, có kích thước mô phỏng vùng các gene mục tiêu, được tổng hợp bởi Intergrated DNA Technologies. Amplicon được pha loãng về các nồng độ thấp hơn theo bậc pha loãng 10 bằng TE 1X.

**Bảng 3.** Trình tự các amplicon được sử dụng

STT	Tên	Trình tự primer	Size (bp)
1	<b>yccT</b>	5'- GTTGG CATGG CGGCG CGCGT CTTTG CAGCG TACCA GAAGA TCGAC ATCGG TTGAA AGCCG CAGCG TGGTG GCAAA AACGG ATACC GGCAA ACATA ATGCA ATCAA GGTGG TCACG ATAGT GGCGA TGA CTGGA A -3'	137
2	<b>glytA</b>	5'- AAGCG GAGCC GGCGG CAAAG ACAAG CCGGC GACGT CCTTA TAGGC CGAAT ATGAC GAATT CAAAA CTACC GTCAC CCGCC ACACC ATGAT TCATG AGCAG ATCAC CCCGG TGTTG ATGGC ATGGC GCCAG TTTA TCA -3'	138
3	<b>GryB</b>	5'- TTTAT CAAGA TTAG CTCGT CGTAT TGGAC TTGAA CTCAT GTCTA ATGGC GCCAG TTTAT CATAC ATAAC CTGAC CATCC GTCGC CACAA CAAGG TCTGG GAACA GGTCT ACCAC CACGG CGTTC CGCAG TTCCC ACTGC GCGAA GTGGG CGAGA CCGAT GGCTC CGGCA CCGAA GTTCA CTTCA AGCCG TCCCC GGAGA CCTTC AGCAA CATCC ACTTC AGTTG GGACA TCCTG GCCAA GCGCA TCCGC GAGCT GTCCT TCCTC AACTC CGGCG TCGGC ATCCT GCTGC GAGTG GCGAT GACTC TGGAA-3'	310

4	<b>blaOX A-51</b>	5'- TTTAT CAAGA TTTAG CTCGT CGTAT TGGAC TTGAA CTCAT GTCTA AGGAA GTGAA GCGTG TTGGT TATGG CAATG CAGAT ATCGG TACCC AAGTC GATAA TTTT GGCTG GTGGG TCCTT TAAAA ATTAC TCCTC AGCAA GAGGC ACAG CT -3'	152
5	<b>Nuc_ mecA</b>	5'- AACAAAGCATCCTAAAAAAGGTGTAGAGAAATATG GTCCTGAAGCAAGTGCATTTACGAAAAAATGGTA GAAAATGCAAAGAAAATTGAAGTCGAGTCCAACGT GATTGCAGCGATAATAGAAGCTATCCACAAACGAA TTTCGCAGTGTCCACCTCAGAAACACGCCCAGTATT GACTGGTGTGAACTAATAATGGCAATATTAACGCA CCTCACTTATTAAGACACGAAAAACAAAGTTTG GAAGAAAAATATTATTTCCAAAGAAAATATCAATC TATTAAGTATGGTATGCAACAAGTCGTAAATAAA ACACATAAAGAAGATATTTATAGATCTTATGCAA CTTAATTGGCAAATCCGGTACTGCAGAACTCAAAA TGAAACAAGGAGAACTGGCAGACAAATT -3'	415
6	<b>tufSA</b>	5'- CCATGCGAGTACGGAAATAGAATTGTGGGCGATAG TTAGTGAAGAATGGAGTGTGACGTCCACCTTCATCT TTAGATAATACGTATACTTCAGCTTTGAATTTTGTG TGTGGTGTAAATAGAACCAGGAGCAGCTAATACTTG ACCACGTTGTACGTCTTCACGTGCAACACCACGTA ATAAAGCACCGATGTTGTCACCAGCTTCAGCGTAG TCTAATAATTTACGGAACATTTCTACACCAGTAACA GTTGTTTGATTCGTC -3'	264

### **3. Phương pháp tách chiết**

DNA vi khuẩn được thu nhận bằng phương pháp tách chiết tủa, sử dụng bộ tách chiết AccuRive pDNA PrepKit (Khoa Thương). DNA bộ gen của các phần tử tế bào vi khuẩn có trong mẫu đờm, dịch phết quản được thu nhận bằng phương pháp tách chiết dựa trên hạt từ phủ silica. Các thành phần như guanidine isothiocyanate, chất tẩy, tris, EDTA có trong dung dịch ly giải có vai trò chính trong việc phá vỡ cấu trúc protein của màng tế bào người và vỏ capsid. Ngoài ra, hoạt động biến tính protein của các chất này cũng làm bất hoạt các enzyme phân hủy DNA có trong hỗn hợp. Đồng thời trong dung dịch ly giải chứa nồng độ muối cao và pH thích hợp cho phép DNA gắn với silica trên hạt từ. Phức hợp DNA-hạt từ sau đó được chuyển lần lượt sang các giếng chứa dung dịch đệm có ethanol để rửa sạch các chất bẩn và ức chế. Dung dịch này đảm bảo việc làm sạch DNA, sau đó làm khô để loại hết ethanol. Cuối cùng, DNA được dung giải trong dung dịch đệm nồng độ muối thấp trước khi sử dụng cho phản ứng PCR.

**4. Thiết bị sử dụng:** Toàn bộ qui trình thực hiện trên máy Rotor-Gene Q (Qiagen)

### **5. Thiết kế quy trình**

Xây dựng quy trình định lượng. Số lượng DNA vi khuẩn ban đầu có trong phản ứng được xác định dựa vào một đường chuẩn. Đường chuẩn này được xây dựng từ giá trị Ct của 4 mix phản ứng có nồng độ khác nhau ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$ ) của các đoạn DNA amplicon mô phỏng vùng gene của vi khuẩn được nhân bản. Giá trị sử dụng cho trục tung của đường chuẩn là giá trị Ct, giá trị sử dụng cho trục hoành của đường chuẩn là số lượng copies trình tự mục tiêu ban đầu. Lượng trình tự mục tiêu ban đầu có trong ống phản ứng với mẫu xét nghiệm được xác định dựa vào đường chuẩn và giá trị Ct thu được của mỗi mẫu xét nghiệm.

## **6. Kiểm tra hoạt động của môi và probe**

Kiểm tra hoạt động của môi và probe bằng cách thực hiện phản ứng PCR với các chủng chuẩn. Thực hiện phản ứng monoplex với thành phần phản ứng như sau: primer 0,5 $\mu$ M, probe 0,2  $\mu$ M, h-Taq 1,25 unit/phản ứng, MgCl<sub>2</sub> 3 mM và dNTP 0,2 mM. Chương trình real-time PCR: 1 chu kỳ: 95°C – 15 phút; 40 chu kỳ: 95°C – 20 giây; 60°C – 60 giây (Đọc tín hiệu).

*Kết quả cho nhận xét chung là:* Dựa vào biểu đồ khuếch đại gen từ DNA của các chủng vi khuẩn chuẩn đều cho giá trị Ct của chúng, nhận thấy mẫu DNA có tín hiệu huỳnh quang vượt tín hiệu huỳnh quang nền và có dạng tín hiệu của một phản ứng realtime PCR chuẩn. Mẫu đối chứng âm có tín hiệu thấp hơn tín hiệu huỳnh quang nền. Như vậy, môi và probe có khả năng bắt cặp và nhân bản các chủng mục tiêu tương ứng và không có hiện tượng bắt cặp giữa các mục tiêu.

## **7. Tối ưu hóa phản ứng realtime PCR**

### ***7.1. Đánh giá hiệu quả nhân bản đơn môi (monoplex):***

Thực hiện phản ứng monoplex với thành phần như sau: primer 0,5 $\mu$ M; probe 0,2  $\mu$ M; h-Taq 1,25 unit/ phản ứng, MgCl<sub>2</sub> 3 mM và dNTP 0,2 mM. Chương trình realtime PCR: 1 chu kỳ: 95°C– 15 phút; 40 chu kỳ: 95°C- 20 giây. 60°C – 60 giây (Đọc tín hiệu). Thử trên hỗn hợp amplicon các nồng độ E1 đến E7. Phản ứng monoplex đạt khi hiệu quả nhân bản từ 90 - 105% và Ct của chúng nội tương đương nhau giữa các nồng độ amplicon.

### ***7.2. Tối ưu hóa phản ứng đa môi (multiplex PCR)***

Thực hiện phản ứng multiplex với thành phần như sau: primer target 0,5  $\mu$ M, probe target 0,2  $\mu$ M, primer IC 0,5  $\mu$ M, probe IC 0,2  $\mu$ M, h-Taq 1,25 unit/phản ứng, MgCl<sub>2</sub> 3 mM và dNTP 0,2 mM. Thử trên hỗn hợp amplicon các nồng độ E1 đến E7 bản sao/ phản ứng và amplicon được cố định ở E2 bản sao/ phản ứng. Phản ứng multiplex đạt khi Ct của monoplex và multiplex tương đương nhau chứng nội tương đương nhau giữa các nồng độ amplicon.

Tối ưu hóa phản ứng multiplex đến khi giá trị Ct của monoplex và multiplex tương đương nhau. Thực hiện tối ưu bằng cách tăng DNA polymerase, dNTPs và MgCl<sub>2</sub>.

### 8. Độ nhạy phân tích- LOD95

Độ nhạy được thực hiện trên máy Rotor Gene-Q. Kết quả LOD<sub>95</sub> được tính bằng bằng phần mềm PODLOD calculation program, version 9.

**Bảng 4.** Độ nhạy phân tích- LOD95 đối với các vi khuẩn *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii*, *E.coli*

Chủng mục tiêu	Số lần phát hiện được trên các nồng độ (bản sao/ phản ứng)				
	2	10	20	40	LOD95
<b>Kp</b>	9/12	12/12	12/12	12/12	4,23
<b>Ac</b>	10/12	12/12	12/12	12/12	3,34
<b>Ec</b>	10/12	12/12	12/12	12/12	4,23
	<b>20</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>LOD95</b>
<b>Pa</b>	8/12	12/12	12/12	12/12	44,67

**Kết quả:** Ngưỡng phát hiện của quy trình (bản sao/ phản ứng) *P.aeruginosa* là 44,67, *K.pneumoniae* là 4,23, *A.baumannii* là 3,34, *E.coli* là 3,34.

**Bảng 5.** Độ nhạy phân tích- LOD95 với *S.aureus*

DNA đích	Số lần phát hiện được trên các nồng độ (bản sao/phản ứng)				
	1	10	100	1000	LOD95
<b>Nuc</b>	6/12	12/12	12/12	12/12	4,67
<b>mecA</b>	6/12	11/12	12/12	12/12	7,11
	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>	<b>10000</b>	<b>LOD95</b>
<b>Tuf</b>	5/12	8/12	12/12	12/12	181,85

**Kết quả:** Ngưỡng phát hiện của quy trình (bản sao/ phản ứng) đối với *S.aureus* với gen *mecA*: 7,11; *nuc*: 4,67; *tuf*: 181,85.



## 9. Độ đặc hiệu

Kiểm tra độ đặc hiệu của quy trình với các chủng vi khuẩn chuẩn đã biết.

**Bảng 6.** Kết quả qui trình định lượng các chủng mục tiêu *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii* và *E.coli* được thực hiện trên các chủng chuẩn

STT	Chủng	Giá trị Ct của chủng mục tiêu			
		Pa	Kp	Ac	Ec
1	<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0
2	<i>Listeria ivanovii</i>	0	0	0	0
3	<i>Campylobacter coli</i>	0	0	0	0
4	<i>Campylobacter jejuni</i>	0	0	0	0
5	<i>Chlamydia trachomatis</i>	0	0	0	0
6	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0	0	0	0
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	34,75	0	0
8	<i>Vibrio cholerae</i>	0	0	0	0
9	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	0	0	0
10	<i>Helicobacter pylori</i>	0	0	0	0
11	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0
12	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0
13	<i>Shigella boydii</i>	0	0	0	15,25
14	<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	16,74
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21,97	0	0	0
16	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0	0	0
17	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	16,38
18	<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	0	0
19	<i>Salmonella paratyphi</i>	0	0	0	0
20	<i>Clostridium botulinum</i>	0	0	0	0
21	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	27,05	0

**Kết quả:** Qui trình chỉ phát hiện các vi khuẩn *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii* đặc hiệu với chủng mục tiêu. Chỉ riêng đối với *E.coli* có xảy ra phản ứng chéo với *Shigella*.

**Bảng 7.** Kết quả qui trình định lượng của *S.aureus* trên các chủng chuẩn

STT	Chủng	Giá trị Ct tuf - ROX	Giá trị Ct nuc- HEX	Giá trị Ct mecA – FAM
1	<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0
2	<i>Listeria ivanovii</i>	0	0	0
3	<i>Campylobacter coli</i>	0	0	0
4	<i>Campylobacter jejuni</i>	0	0	0
5	<i>Chlamydia trachomatis</i>	0	0	0
6	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0	0	0
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0
8	<i>Vibrio cholerae</i>	0	0	0
9	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	0	0
10	<i>Helicobacter pylori</i>	0	0	0
11	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0
12	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0
13	<i>Shigella boydii</i>	0	0	0
14	<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0
16	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0	0
17	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
18	<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	0
19	<i>Salmonella paratyphi</i>	0	0	0
20	<i>Clostridium botulinum</i>	0	0	0
21	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	0
22	<i>Staphylococcus aureus</i>	26,01	18,32	0
23	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	21,73	0	0
24	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	24,83	0	0
25	<b>MRSA</b>	19,90	18,88	19,94

**Kết quả:** Qui trình chỉ phát hiện các vi khuẩn thuộc nhóm *Staphylococci* đặc hiệu với chủng mục tiêu.

Như vậy với qui trình phát hiện và định lượng các vi khuẩn *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii* và *E.coli* với độ nhạy lần lượt là

44,67; 4,23 và 3,34 bản sao/ phản ứng với khoảng khuếch đại từ 10 đến 1.000.000 bản sao. Ngoài trừ, qui trình *E.coli* có phản ứng chéo đối với chủng *Shigella*, tất cả qui trình còn lại đều đặc hiệu với chủng mục tiêu. *E.coli* và *Shigella* có mức độ tương đồng cao về bộ gen (80-90%) nên rất khó để tìm được vùng mục tiêu đặc hiệu riêng cho chủng *E.coli* [69]. Tuy nhiên, điều này không ảnh hưởng đến giá trị chẩn đoán của qui trình vì *Shigella* rất hiếm khi được tìm thấy trong hệ hô hấp và không được xem là tác nhân gây bệnh trong nhiễm trùng hô hấp dưới. Ngoài ra, nghiên cứu của chúng tôi cũng xây dựng thành công qui trình phát hiện *S.aureus*, *S.coagulase* âm và khả năng kháng kháng sinh của chúng. Độ nhạy của qui trình trên các gen mục tiêu *mecA*, *nuc* và *tuf* lần lượt là 7,11; 4,67 và 181,85 bản sao/ phản ứng. Và chúng tôi sẽ sử dụng bộ KIT này cũng như qui trình để áp dụng vào nghiên cứu.

## PHỤ LỤC

**Bảng 1.** Khuyến cáo điều trị VPLQTM do các trực khuẩn Gram âm

<b>Nghi ngờ VPLQTM do <i>A.baumannii</i></b>		<b>Yếu tố nguy cơ</b>
Tỷ lệ đề kháng ở đơn vị hồi sức tích cực cao và/hoặc BN đã từng được biết có VK cư trú kháng KS		Tuổi cao, suy giảm miễn dịch; chấn thương sọ não; ARDS; hút rửa phổi thể tích lớn; có mở khí quản; thời gian nằm viện- nằm khoa hồi sức cấp cứu kéo dài; sử dụng kháng sinh trước đó; có tiền sử nhiễm <i>A.baumannii</i> ; có tỷ lệ <i>A.baumannii</i> đa kháng cao tại đơn vị điều trị.
<b>Không: đơn trị liệu</b> Các carbapenem Các cephalosporin Ampicillin/sulbactam	<b>Có: phối hợp các KS</b> Carbapenem Và colistin Và ampicillin/sulbactam	
<b>VPLQTM do <i>A.baumannii</i></b>		
Xu hướng nhạy carbapenem và LS cải thiện <b>Đơn trị liệu:</b> Carbapenem Hoặc ampicillin/sulbactam Hoặc các KS nhạy cảm khác	Xu hướng kháng carbapenem; kháng rộng rãi/toàn kháng và lâm sàng không cải thiện <b>Phối hợp điều trị:</b> Kết hợp 2 trong các KS: colistin, aminoglycosid, ampicillin/sulbactam, liều cao carbapenem, minocycline, tigercycline	
<b>Nghi ngờ VPLQTM do <i>P.aeruginosa</i></b>		<b>Yếu tố nguy cơ</b>
Tỷ lệ đề kháng KS ở đơn vị hồi sức cấp cứu cao và/hoặc bệnh nhân đã được biết có vi khuẩn cư trú có xu hướng kháng KS		Tuổi cao, có suy giảm miễn dịch; bệnh xơ nang phổi; sốc nhiễm khuẩn; mở khí quản; có phẫu thuật; nằm viện/nằm hồi sức tích cực dài ngày; dùng KS trước đó; BN có <i>P.aeruginosa</i> cư trú; tỷ lệ <i>P.aeruginosa</i> đa kháng tại nơi điều trị cao
<b>Phối hợp các KS:</b> Beta- lactam kháng pseudomonas Và aminoglycosid (hoặc fluoroquinolon) Hoặc colistin truyền tĩnh mạch		
<b>VPLQTM do <i>P.aeruginosa</i></b>		
Không kháng KS và LS cải thiện <b>Đơn trị liệu:</b> kháng pseudomonas Các cefalosporin Beta-lactam/beta-lactamase (Fluoroquinolon)	Xu hướng kháng carbapenem rộng rãi/toàn kháng <b>Phối hợp KS:</b> Carbapenem và colistin Ceftazidim/avibactam + Atreonam	
<b>Nghi ngờ VPLQTM do <i>K.pneumonia</i> sinh KPC</b>		<b>Yếu tố nguy cơ</b>

Có tỷ lệ lưu hành gen KPC nơi điều trị	<p>Tuổi cao, có suy giảm miễn dịch; tiền sử nằm viện và/hoặc chuyển đến từ những đơn vị chăm sóc sức khỏe; sốc nhiễm khuẩn; sử dụng carbapenem trước đó; bệnh nhân có <i>K.pneumonia</i>- KPC cư trú; tỷ lệ <i>K.pneumonia</i>- KPC nơi điều trị cao</p>
<p><b>Phối hợp các KS:</b>  Carbapenem liều cao  Và colistin truyền tĩnh mạch  Hoặc aminoglycosid  Và/hoặc tigercycline</p>	
<p><b>VPLQTM do <i>K.pneumonia</i> sinh KPC</b></p>	
<p>Liều cao carbapenem và colistin truyền tĩnh mạch và/hoặc tigecycline  Colistin hoặc aminoglycosid và/hoặc tigecycline và/hoặc rifampicin  Carbapenem kép (meropenem + ertapenem) và bất kỳ thuốc KS nhạy cảm khác</p>	
<p><b>Nghi ngờ VPLQTM do <i>E.coli</i> sinh ESBL</b></p>	<b>Yếu tố nguy cơ</b>
<p>Dịch tể có tỷ lệ <i>E.coli</i> sinh ESBL nơi điều trị cao</p>	<p>Tuổi cao, có suy giảm miễn dịch; sốc nhiễm khuẩn; BN có tỷ lệ <i>E.coli</i> sinh ESBL cư trú nơi điều trị cao</p>
<p>Carbapenem  Hoặc Beta-lactam phổ hẹp  Và aminoglycosid hoặc ciprofloxacin  Hoặc piperacillin/tazobactam</p>	
<p><b>VPLQTM do <i>E.coli</i> sinh ESBL</b></p>	
<p>Carbapenem  Hoặc beta-lactam/beta-lactamase (piperacillin/tazobactam)  Và aminoglycosid hoặc ciprofloxacin</p>	

**Bảng 2.** Gợi ý kháng sinh điều trị theo kinh nghiệm điều trị VPLQTM

Lâm sàng	Nhóm kháng sinh chọn	Kháng sinh cụ thể
VPLQTM sớm (< 5 ngày), không có nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng (MDR)*	Kháng sinh nhóm $\beta$ -lactam không diệt <i>Pseudomonas</i>	Amoxicillin/clavulanic <sup>18</sup> acid hoặc cephalosporin thế hệ thứ 3
VPLQTM muộn ( $\geq$ 5 ngày), <b>hoặc</b> có nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng (MDR)	Kháng sinh nhóm $\beta$ -lactam diệt <i>P.aeruginosa</i> và nhóm kháng sinh khác diệt <i>Pseudomonas</i>	Cefepime 2g/8giờ <b>hoặc</b> Ceftazidime 2g/8giờ <b>hoặc</b> Piperacillin–tazobactam 4g/ 6 giờ <b>hoặc</b> Meropenem 2g/8 giờ Amikacin 2,5mg/kg/ngày <b>hoặc</b> Ciprofloxacin 1200mg/ngày
Có <i>Staphylococcus aureus</i> cư trú <b>hoặc</b> ở đơn vị điều trị có tỷ lệ nhiễm <i>Staphylococcus aureus</i> kháng methicillin cao (> 25%)	Kháng sinh diệt tụ cầu vàng kháng methicillin (MRSA)	Vancomycin 30–45 mg/kg/ngày <b>hoặc</b> Linezolid 600 mg/12giờ
Có <i>Enterobacteriaceae</i> kháng carbapenem cư trú hoặc <i>P.aeruginosa</i> chỉ nhạy cảm với kháng sinh nhóm $\beta$ -lactam mới.	Kháng sinh nhóm $\beta$ -lactam mới.	Ceftolozane–tazobactam 3g/ 8 giờ <b>hoặc</b> Ceftazidime–avibactam 2,5g/ 8 giờ <b>hoặc</b> Meropenem–vaborbactam 4g/8 giờ <b>hoặc</b> Imipenem–relebactam 1,5g/ 6 giờ.

(\*) Tình huống lâm sàng không có trong khuyến cáo hướng dẫn của Hiệp hội nhiễm khuẩn và Hiệp hội lồng ngực Hoa kỳ (IDSA/ATS).

**Bảng 3.** Các phác đồ và liều lượng kháng sinh được khuyến cáo (với độ thanh thải creatinin > 50ml/phút) điều trị VPBV- VPLQTM liên quan đến trực khuẩn *A.baumannii* và *Enterobacteriaceae* kháng thuốc<sup>69</sup>

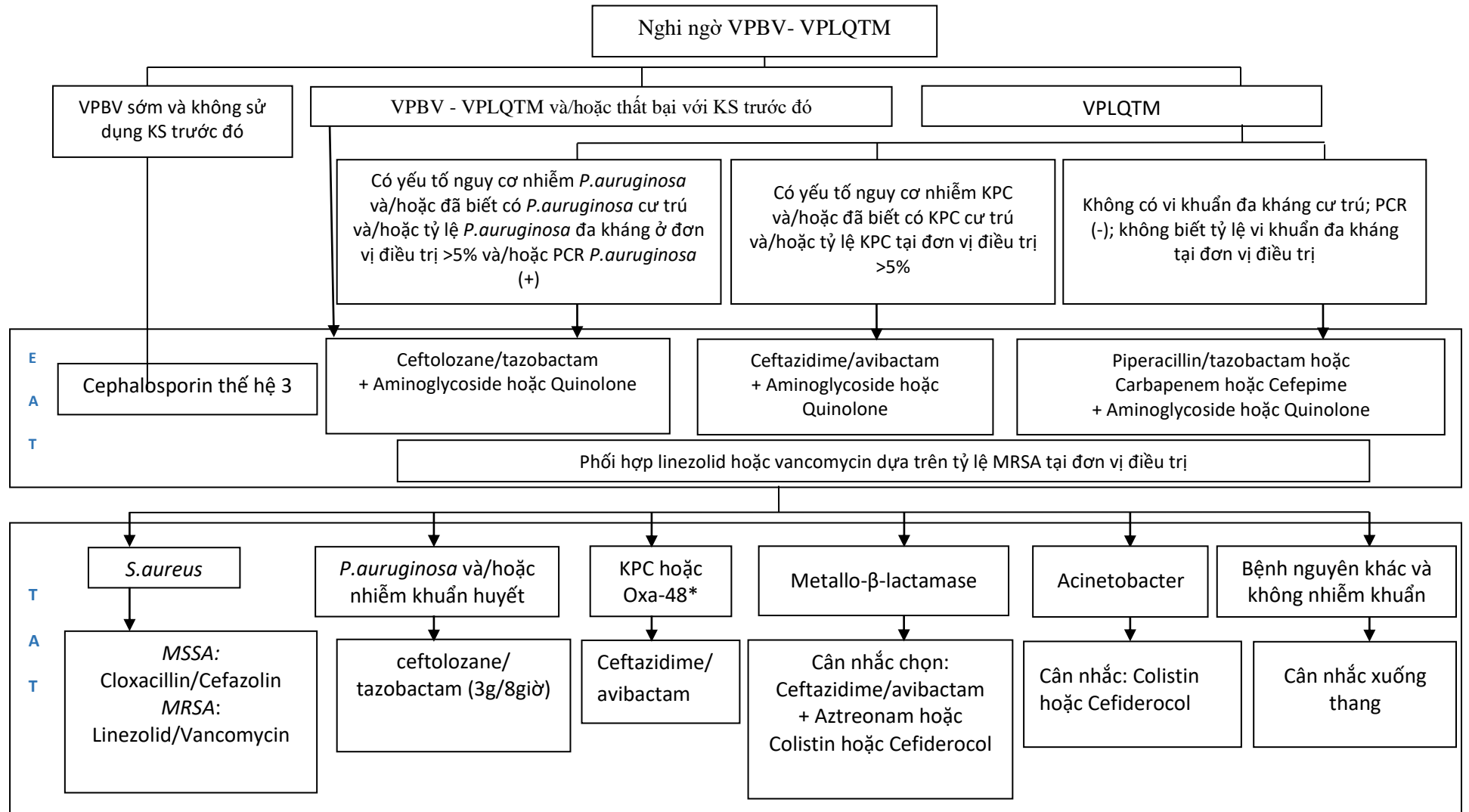
Vi khuẩn	Các kháng sinh được khuyến cáo
<p><i>Acinetobacter baumannii</i> kháng carbapenem hoặc kháng thuốc rộng rãi</p>	Ampicillin/sulbactam (1,5g/lọ): 3g/6giờ truyền nhỏ giọt tĩnh mạch (Nếu huyết động ổn định)
	Khí dung colististimate sodium(2 MUI/lọ): 2 lọ/ 8giờ (Nếu huyết động ổn định).
	Liều cao meropenem (truyền tĩnh mạch kéo dài 3giờ), hoặc doripenem (truyền tĩnh mạch kéo dài 3giờ), hoặc imipenem/cilastatin, thêm sulbactam: 2.0g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/6giờ, hoặc colistin (66.8 mg/lọ): 2.5–5.0mg/kg/ngày truyền nhỏ giọt tĩnh mạch (2–3 lần/ngày).
	± Khí dung colistimethate sodium (2 MUI/ lọ): 1–2 lọ/12giờ hoặc mỗi 8giờ, hoặc ± Amikacin: 15–20 mg/kg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch một lần/ngày, nếu có nhiễm khuẩn huyết nặng và/ hoặc nhiễm khuẩn tiết niệu, và kháng sinh đồ nhạy cảm với amikacin
	Tigecycline: 50 mg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/12giờ (sau 150–200 mg liều nạp + carbapenem (truyền tĩnh mạch kéo dài 3giờ nếu cần thiết)
<p><i>Enterobacteriaceae spp</i> kháng carbapenem</p>	Tigecycline: 50 mg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/12 giờ (sau khi nạp 150–200 mg) + Meropenem: 2g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch kéo dài/ 8giờ, và colistin (66,8 mg/ lọ): 1lọ truyền nhỏ giọt tĩnh mạch /8giờ, hoặc 2 lọ truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/12giờ; hoặc Fosfomycin: 2g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/ 6giờ.
	Ceftazidime-avibactam: 2,5g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/ 8giờ.
	Sử dụng carbapenem kép (ertapenem: 1g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/ ngày + meropenem liều cao hoặc doripenem (truyền tĩnh mạch kéo dài 3giờ)) ( <i>Enterobacteriaceae</i> sinh gen kháng carbapenem KPC; kháng colistin) <sup>117</sup> .

**Bảng 4.** Các phác đồ và liều lượng kháng sinh được khuyến cáo (với độ thanh thải creatinin > 50ml/ phút) điều trị VPBV- VPLQTM do P.aeruginosa và/ hoặc do S.aureus kháng methicillin

<b>Mức độ nặng và yếu tố nguy cơ</b>	<b>Kháng sinh khuyến cáo</b>
Huyết động ổn định, nguy cơ đa kháng thuốc thấp	Sử dụng bất kỳ KS chống Pseudomonas nào (trừ đơn trị liệu aminoglycosid )
Huyết động không ổn định, hoặc nguy cơ cao nhiễm trực khuẩn Gram âm đa kháng thuốc	<b>Đơn trị liệu với bất kỳ kháng sinh nào dưới đây:</b>
	Ceftolozane-tazobactam: 1,5g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch mỗi 8giờ <sup>39</sup>
	Ceftazidime-avibactam: 2,5g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch mỗi 8giờ hoặc
	Piperacillin-tazobactam: 4,5g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch kéo dài 3 giờ mỗi 6giờ
	Ceftazidime: 2g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch kéo dài 3 giờ mỗi 8giờ
	Cefepime: 2g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch kéo dài 3 giờ mỗi 12giờ hoặc mỗi 8giờ
	Imipenem/cilastatin sodium: 500 mg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch mỗi 6giờ hoặc 1g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch mỗi 8giờ
	Meropenem: 1–2g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch kéo dài 3 giờ mỗi 8giờ
	Cefoperazone-sulbactam: 4g truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/ 12giờ
+ Bất kỳ kháng sinh nào dưới đây:  Ciprofloxacin: 400mg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch mỗi 8giờ (ưu tiên), hoặc thay thế bằng levofloxacin: 750mg/ngày	



	<p>Colistin (66,8mg/l): 5mg/kg liều nạp truyền nhỏ giọt tĩnh mạch, sau đó 2,5mg x (1,5 x CrCl + 30) truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/ 12giờ. ± colistimethate sodium khí dung (2MUI/l): 1–2l/ 12giờ hoặc 8giờ, hoặc ± Amikacin: 15–20 mg/kg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch/ngày, nếu có nhiễm khuẩn huyết kết hợp nhiễm khuẩn tiết niệu và kháng sinh đồ nhạy cảm với amikacin</p>
<p>Nguy cơ nhiễm <i>Staphylococcus aureus</i> kháng methicillin (MRSA)</p>	<p>Vancomycin: liều nạp 25–30 mg/kg, sau đó duy trì 15mg/kg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch mỗi 12giờ, hoặc</p>
	<p>Teicoplanin: liều nạp: 12mg/kg mỗi 12giờ x 3 lần, sau đó duy trì 6–12mg/kg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch một lần/ngày, hoặc</p>
	<p>Linezolid: 600 mg truyền nhỏ giọt tĩnh mạch mỗi 12 giờ</p>



**Sơ đồ 2. Cập nhật điều trị kháng sinh VPBV- VPLQTM theo kinh nghiệm**

\* EAT (Empirical Antibiotic Treatment) Điều trị kháng sinh theo kinh nghiệm; TAT (Target Antibiotic Treatment): Điều trị kháng sinh theo đích

**Bảng 1.** Các kháng sinh ban đầu điều trị VPBV theo kinh nghiệm

Viêm phổi bệnh viện không phải mức độ nặng và không có nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng	Viêm phổi bệnh viện nặng hoặc có nguy cơ nhiễm vi khuẩn đa kháng	Viêm phổi bệnh viện không phải mức độ nặng nhưng có nguy cơ nhiễm <i>Staphylococcus aureus</i> kháng methicillin
<i>Một trong những lựa chọn sau</i>	<i>Hai trong các lựa chọn sau, tránh dùng 2 beta lactam</i>	<i>Một trong những lựa chọn sau</i>
+ Piperacillin-tazobactam 4,5g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 6 giờ	+ Piperacillin-tazobactam 4,5g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 6 giờ.	+ Piperacillin-tazobactam 4,5g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 6 giờ.
HOẶC	HOẶC	HOẶC
Cefepime 2g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 8 giờ	Cefepime hoặc Ceftazidime 2g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 8 giờ.	Cefepime 2g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 8 giờ.
HOẶC		
+ Levofloxacin . 750mg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ . Hoặc 500 mg truyền tĩnh mạch mỗi 12 giờ trong nhiễm khuẩn nặng	+ Levofloxacin . 750mg truyền tĩnh mạch mỗi 24giờ . Hoặc 500 mg truyền tĩnh mạch mỗi 12 giờ trong nhiễm khuẩn nặng + Ciprofloxacin 400mg truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ	+ Levofloxacin . 750mg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ Hoặc 500 mg truyền tĩnh mạch mỗi 12 giờ trong nhiễm khuẩn nặng + Ciprofloxacin 400mg truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ
HOẶC	HOẶC	HOẶC
Imipenem 500mg truyền tĩnh mạch trong 3 giờ mỗi 6 giờ	Imipenem 500mg truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 6 giờ Meropenem 1g truyền tĩnh mạch trong 4 giờ, mỗi 8 giờ Doripenem 0,5 – 1 g truyền tĩnh mạch trong 4 giờ, mỗi 8 giờ	Imipenem 500mg truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 6 giờ Meropenem 1g truyền tĩnh mạch trong 4 giờ, mỗi 8 giờ Doripenem 0,5 – 1g truyền tĩnh mạch trong 4 giờ, mỗi 8 giờ
	HOẶC	HOẶC
	+ Amikacin 15 - 20mg/kg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ + Gentamycin 5 -7mg/kg truyền	Aztreonam 2g truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ

	tĩnh mạch mỗi 24 giờ + Tobramycin 5- 7mg/kg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ	
	HOẶC	
	Aztreonam 2g truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ	
	Xem xét kết hợp	Kết hợp
	Vancomycin 15 -20 mg/kg truyền tĩnh mạch trong 1-2 giờ, mỗi 8- 12 giờ. (Có thể dùng liều nạp 25-30 mg/kg 1 lần với những trường hợp nặng) HOẶC Teicoplanin Liều nạp: 6 mg/kg/12 giờ truyền tĩnh mạch trong 30 phút – 1 giờ. Truyền 3liều Liều duy trì: 6 mg/kg/24 giờ (400mg) truyền tĩnh mạch trong 30 phút – 1 giờ.	Vancomycin 15 -20 mg/kg truyền tĩnh mạch trong 1-2 giờ, mỗi 8- 12 giờ. (Có thể dùng liều nạp 25- 30 mg/kg 1 lần với những trường hợp nặng) HOẶC Teicoplanin Liều nạp: 6 mg/kg/12 giờ truyền tĩnh mạch trong 30 phút – 1 giờ. Truyền 3liều Liều duy trì: 6 mg/kg/24 giờ (400mg) truyền tĩnh mạch trong 30 phút – 1 giờ.
	HOẶC	HOẶC
	Linezolid 600mg truyền tĩnh mạch mỗi 12 giờ	Linezolid 600mg truyền tĩnh mạch mỗi 12 giờ

**Bảng 2.** Các kháng sinh ban đầu điều trị VPLQTM theo kinh nghiệm

A. Kháng sinh tác dụng trên vi khuẩn Gram dương <i>S.aureus</i> kháng methicillin	B. Kháng sinh tác dụng trên vi khuẩn Gram âm, <i>P.aeruginosa</i> Nhóm beta –lactam	C. Kháng sinh tác dụng trên vi khuẩn Gram âm, <i>P.aeruginosa</i> Nhóm không phải beta-lactam
<p>Nhóm Glycopeptides: - Vancomycin 15 -20 mg/kg truyền tĩnh mạch trong 1-2 giờ, mỗi 8- 12giờ. (Có thể dùng liều nạp 25-30 mg/kg/lần với trường hợp nặng) - Teicoplanin: Nạp: 6mg/kg /12 giờ truyền TM trong 30 phút – 1 giờ x 3 liều. Duy trì: 6mg/kg/24giờ (400mg) truyền TM trong 30 phút – 1 giờ</p>	<p>Các penicillin kháng <i>Pseudomonas aeruginosa</i>: Piperacillin-tazobactam 4,5g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 6 giờ</p>	<p>Các fluoroquinolone - Ciprofloxacin 400mg truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ - Levofloxacin: 750mg truyền tĩnh mạch/24 giờ hoặc 500mg truyền tĩnh mạch/ 12giờ trong nhiễm khuẩn nặng</p>
HOẶC	HOẶC	HOẶC
<p>Oxazolidiones: Linezolid 600mg truyền tĩnh mạch mỗi 12 giờ</p>	<p>Các cephalosporin Cefepime 2g truyền tĩnh mạch trong 3 giờ mỗi 8 giờ Ceftazidime 2g truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ</p>	<p>Các aminoglycoside Amikacin 15- 20 mg/kg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ. Gentamycin 5 – 7 mg/kg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ Tobramycin 5 – 7 mg/kg truyền tĩnh mạch mỗi 24 giờ</p>
HOẶC	HOẶC	HOẶC
	<p>Các carbapenem Imipenem 500mg truyền tĩnh mạch trong 3 giờ, mỗi 6 giờ Meropenem 1g truyền tĩnh mạch trong 4 giờ, mỗi 8 giờ Doripenem 0,5 – 1g, truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ</p>	<p>Các polymixin Colistin Liều nạp 5mg/kg x 1 lần Liều duy trì: 2,5 mg/kg x (1,5 x độ thanh thải creatinin +30) truyền tĩnh mạch mỗi 12 giờ Polymixin B 2,5 – 3,0 mg/kg/ngày chia 2 lần truyền tĩnh mạch</p>
HOẶC	HOẶC	
	<p>Monobactam Aztreonam 2g truyền tĩnh mạch mỗi 8 giờ.</p>	

**Bảng 3.** Danh sách các chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu

<b>Tên</b>	<b>Loại mẫu</b>	<b>Nguồn mẫu</b>
<i>A. baumannii</i>	Chủng chuẩn ATCC@19606	Khoa Thương
<i>S. epidermidis</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>P. aeruginosa</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>K. pneumoniae</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>Escherichia coli</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>S.aureus</i>	Dịch khuẩn	BV Thanh Nhàn
<i>Listeria monocytogenes</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Listeria ivanovii</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Campylobacter coli</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Campylobacter jejuni</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Chlamydia trachomatis</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Vibrio cholerae</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Helicobacter pylori</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Shigella boydii</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Shigella sonnei</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Streptococcus agalactiae</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Salmonella typhimurium</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Salmonella paratyphi</i>	DNA	Khoa Thương
<i>Clostridium botulinum</i>	DNA	Khoa Thương

**Bảng 4.** Thành phần hoá chất phản ứng PCR, vật tư tiêu hao và điều kiện bảo quản của các hoá chất

STT	Tên Hóa chất/ vật liệu	Thành phần chính	Số lượng	Bảo quản
<b>Hóa chất xử lý mẫu</b> AccuRive TB ProcSample Kit, EX-PRO01.1A				
1	Dung dịch KTL2		1 x 10 ml	Nhiệt độ phòng
2	Dung dịch KTL3		1 x 500 µl	Nhiệt độ phòng
3	Dung dịch KTL4		1 x 300 µl	2-8°C
4	Dung dịch KTL6		1 x 50 ml	2-8°C
5	Dung dịch KTL7		1 x 500 ml	Nhiệt độ phòng
6	Dung dịch KTL8		1 x 370 ml	Nhiệt độ phòng
<b>Hóa chất tách chiết cột DNA</b> AccuRive sDNA PrepKit - EX-DNA02.1F				
7	Dung dịch KTC1	<i>Guanidine hydrochloride</i>	1 x 15ml	Nhiệt độ phòng
8	Dung dịch KTC2	<i>Iso-propanol</i>	1 x 10ml	Nhiệt độ phòng
9	Dung dịch KTC3	<i>Guanidine hydrochloride, Ethanol</i>	1 x 30ml	Nhiệt độ phòng
10	Dung dịch KTC4	<i>Ethanol</i>	1 x 30 ml	Nhiệt độ phòng
11	Dung dịch KTS5		1 x 5ml	Nhiệt độ phòng
12	Dung dịch KTL4		1 x 0,5ml	2-8°C
13	Cột silica		50 cột	Nhiệt độ phòng
14	Eppendorf 2,0 ml		100 cái	Nhiệt độ phòng
15	Eppendorf 1,5 ml		100 cái	Nhiệt độ phòng
<b>Hóa chất PCR</b>				
16	DNA IC	<i>DNA chứng nội ngoại sinh</i>	1 x 0.5 ml	-20 °C hoặc lạnh sâu hơn
17	<i>MasterMix Q01ABA02.1A – MM</i>	<i>-Tris-HCL Ph 8.0, KCl, MgCl<sub>2</sub> -dATP, dTTP, dCTP, dGTP -Taq DNA polymerase</i>	3 x 200µl	-20 °C hoặc lạnh sâu hơn
18	<i>PrimobeMix Q01ABA02.1A –PM</i>	<i>-Hệ môi nhân bản vùng gene đích -TaqMan đặc hiệu cho vi khuẩn đích (FAM)</i>	3 x 210 µl	-20 °C hoặc lạnh sâu hơn

		-Hệ môi nhân bản DNA IC -TaqMan đặc hiệu DNA IC (HEX)		
19	Chứng dương E2 (Positive control E2) -PC2	DNA vi khuẩn đích nồng độ $10^2$ bản sao/ $\mu$ l	1 x 30 $\mu$ l	-20 °C hoặc lạnh sâu hơn
20	Chứng dương E3 (Positive control E3) -PC3	DNA vi khuẩn đích nồng độ $10^3$ bản sao/ $\mu$ l	1 x 30 $\mu$ l	-20 °C hoặc lạnh sâu hơn
21	Chứng dương E5 (Positive control E5) -PC5	DNA vi khuẩn đích nồng độ $10^5$ bản sao/ $\mu$ l	1 x 30 $\mu$ l	-20 °C hoặc lạnh sâu hơn
22	Chứng dương E7 (Positive control E7) -PC7	DNA vi khuẩn đích nồng độ $10^7$ bản sao/ $\mu$ l	1 x 30 $\mu$ l	-20 °C hoặc lạnh sâu hơn
23	Eppendorf 0,2 ml/0,1 ml (tùy loại máy realtime sử dụng)		57 ống	Nhiệt độ phòng



**Bảng 5.** Nồng độ chứng dương cho từng tác nhân đích trong phản ứng realtime PCR định lượng

Tác nhân đích	Tên chứng dương	Nồng độ (bản sao)
<i>A.baumannii</i>	Chứng dương E2	$5 \times 10^2$
	Chứng dương E3	$5 \times 10^3$
	Chứng dương E5	$5 \times 10^5$
	Chứng dương E7	$5 \times 10^7$
<i>E.coli</i>	Chứng dương E2	$5 \times 10^2$
	Chứng dương E3	$5 \times 10^3$
	Chứng dương E5	$5 \times 10^5$
	Chứng dương E7	$5 \times 10^7$
<i>K.pneumoniae</i>	Chứng dương E2	$5 \times 10^2$
	Chứng dương E3	$5 \times 10^3$
	Chứng dương E5	$5 \times 10^5$
	Chứng dương E7	$5 \times 10^7$
<i>P.aeruginosa</i>	Chứng dương E2	$5 \times 10^2$
	Chứng dương E3	$5 \times 10^3$
	Chứng dương E5	$5 \times 10^5$
	Chứng dương E7	$5 \times 10^7$
<i>S.aureus</i>	Chứng dương E2	$5 \times 10^2$
	Chứng dương E3	$5 \times 10^3$
	Chứng dương E5	$5 \times 10^5$
	Chứng dương E7	$5 \times 10^7$

**Bảng 6.** Phân tích kết quả trong hỗn hợp phản ứng 1

<b>Phản ứng 1</b>					
Trường hợp	FAM ( <i>A.baumannii</i> )	ROX ( <i>E.coli</i> )	Cy5 ( <i>K.pneumoniae</i> )	HEX (IC)	Kết luận
Trường hợp 1	-	-	-	-	Âm tính giả, thực hiện lại phản ứng từ bước tách chiết
Trường hợp 2	-	-	-	+	Dưới ngưỡng phát hiện với cả 3 VK <i>A.baumannii</i> , <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i>
Trường hợp 3	+	-	-	+/-	Dương tính với VK <i>A.baumannii</i> , Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với <i>A.baumannii</i>
Trường hợp 4	-	+	-	+/-	Dương tính với tác nhân <i>E.coli</i> , Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với <i>E.coli</i>
Trường hợp 5	-	-	+	+/-	Dương tính với tác nhân <i>K.pneumoniae</i> , Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với <i>K.pneumoniae</i>
Trường hợp 6	+	+	-	+/-	Đồng dương tính <i>A.baumannii</i> , <i>E.coli</i> , Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với cả 2 VK <i>A.baumannii</i> , <i>E.coli</i>

Trường hợp 7	+	-	+	+/-	Đồng dương tính <i>A.baumannii</i> , <i>K.pneumoniae</i> . Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với cả 2 tác nhân <i>A.baumannii</i> , <i>K.pneumoniae</i>
Trường hợp 8	-	+	+	+/-	Đồng dương tính <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> .. Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với cả 2 tác nhân <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i>
Trường hợp 9	+	+	+	+/-	Đồng dương tính cả 3 tác nhân <i>A.baumannii</i> , <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> . Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với cả 3 VK <i>A.baumannii</i> , <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i>

**Bảng 7.** Hướng dẫn phân tích kết quả phản ứng Realtime PCR định tính

Phản ứng 2				
Trường hợp	FAM ( <i>P.aeruginosa</i> )	ROX ( <i>S.aureus</i> )	HEX (IC)	Kết luận
Trường hợp 1	-	-	-	Âm tính giả, thực hiện lại phản ứng từ bước tách chiết
Trường hợp 2	-	-	+	Dưới ngưỡng phát hiện <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i>
Trường hợp 3	+	-	+/-	Dương tính với <i>P.aeruginosa</i> . Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với <i>P.aeruginosa</i>
Trường hợp 4	-	+	+/-	Dương tính với <i>S.aureus</i> . Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với <i>S.aureus</i>
Trường hợp 5	+	+	+/-	Đồng dương tính <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i> . Thực hiện phản ứng realtime PCR định lượng với cả 2 tác nhân <i>P.aeruginosa</i> , <i>S.aureus</i>

(+) Tín hiệu huỳnh quang vượt ngưỡng; (-) Tín hiệu huỳnh quang không vượt ngưỡng